

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES INTERACTIONS MÉTABOLIQUES
ENTRE PLUSIEURS MÉDICAMENTS ET DEUX PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS : LE NONYLPHÉNOL ET LE BISPHÉNOL A

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MARC-ANDRÉ VERNER

FÉVRIER 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*Je tiens à remercier les personnes suivantes
pour leur support tout au long de mes recherches*

Ma famille et mes amis

Dr. Sami Haddad, professeur (Université du Québec à Montréal)

Dr. Philip Spear, professeur (Université du Québec à Montréal)

Dr. Catherine Jumarie, professeur (Université du Québec à Montréal)

Michel Marion, technicien de laboratoire (Université du Québec à Montréal)

Victor Dumas, technicien de laboratoire (Université McGill)

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| LISTE DES FIGURES | v |
| RÉSUMÉ | vi |
| PROBLÉMATIQUE | 1 |
| CHAPITRE I | |
| LE NONYLPHÉNOL | 2 |
| 1.1 Sources et exposition | 2 |
| 1.2 Toxicité | 3 |
| 1.3 Toxicocinétique | 4 |
| CHAPITRE II | |
| LE BISPHÉNOL A | 6 |
| 2.1 Sources et exposition | 6 |
| 2.2 Toxicité | 7 |
| 2.3 Toxicocinétique | 7 |
| CHAPITRE III | |
| LA CO-EXPOSITION AUX MÉDICAMENTS ET AUX PERTURBATEURS ENDOCRINIENS | 9 |
| 3.1 Consommation de médicaments | 9 |
| 3.2 Inhibition enzymatique | 10 |
| 3.3 Inhibition enzymatique par les médicaments | 12 |
| 3.4 Synthèse et transport de l'UDPGA | 13 |
| CHAPITRE IV | |
| ARTICLE: INHIBITION OF BISPHENOL A AND NONYLPHENOL BIOTRANSFORMATION BY DRUGS IN RATS | 16 |
| 4.1 Contributions à l'article | 17 |
| 4.2 Abstract | 18 |
| 4.3 Introduction | 19 |
| 4.4 Methods | 21 |

| | | |
|----------------------------|--|----|
| 4.5 | Results | 26 |
| 4.6 | Discussion | 28 |
| 4.7 | Acknowledgments | 33 |
| 4.8 | Figure legend | 34 |
| 4.9 | Figures | 35 |
| 4.10 | Tables | 40 |
| CHAPITRE V | | |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | | 43 |
| 5.1 | Le naproxène | 43 |
| 5.1.1 | Impacts sur la liaison aux protéines dans le sérum | 43 |
| 5.1.2 | Cinétique globale du bisphénol A | 46 |
| 5.2 | L'acide salicylique | 46 |
| 5.3 | Conclusion | 47 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 48 |

LISTE DES FIGURES

| Figures | Page |
|---|------|
| 1.1 Structure moléculaire du nonylphénol | 2 |
| 2.1 Structure moléculaire du bisphénol A | 6 |
| 3.1 Biosynthèse du cofacteur UDPGA | 14 |
| 4.1 Fraction de naproxène libre en fonction de la concentration plasmatique | 44 |

RÉSUMÉ

Le nonylphénol (4-*n*-nonylphénol) et le bisphénol A (4,4'-isopropylidène-2-diphénol) sont des perturbateurs endocriniens qui ont été détectés dans des échantillons de sang, d'urine, de tissus adipeux et de lait humain. Ces molécules sont biotransformées en métabolites non-toxiques par un processus de glucuronidation. Plusieurs facteurs, incluant la co-exposition avec d'autres xénobiotiques, sont susceptibles de réduire les taux de glucuronidation. Les objectifs de cette étude étaient d'identifier et de caractériser l'impact de 14 médicaments dont la consommation est répandue sur la biotransformation de ces perturbateurs endocriniens. L'identification des interactions a été effectuée en co-incubant des hépatocytes de rat fraîchement isolés avec du nonylphénol ou du bisphénol A, et des médicaments à une concentration 50 fois plus élevée que la concentration maximale (C_{max}) reportée chez l'humain suite à une dose thérapeutique. Une inhibition de la biotransformation des polluants a été observée avec la plupart des médicaments. Le naproxène (18,7 mM), l'acide salicylique (24,5 mM), la carbamazépine (1,9 mM) et l'acide méfénamique (1,45 mM) ont inhibé le métabolisme du nonylphénol et du bisphénol A à plus de 50% dans les suspensions d'hépatocytes. La caractérisation des inhibitions observées avec le naproxène, l'acide salicylique et la carbamazépine a été tentée à l'aide de microsomes hépatiques de rat. Le naproxène et la carbamazépine ont inhibé compétitivement la glucuronidation du nonylphénol et du bisphénol A. L'acide salicylique n'a montré aucune inhibition des taux de glucuronidation à une concentration de 1000 µM, suggérant ainsi que d'autres mécanismes d'action sont impliqués dans l'inhibition observée dans les hépatocytes. Des simulations effectuées à l'aide d'un modèle pharmacocinétique à base physiologique ont démontré que des niveaux thérapeutiques de naproxène peuvent entraîner une hausse du C_{max} et de l'aire sous la courbe de la concentration de bisphénol A chez l'humain d'environ 1,8 fois (en assumant un K_i similaire chez le rat et l'humain). En conclusion, cette étude démontre que plusieurs médicaments peuvent inhiber la détoxification de polluants comme le nonylphénol et le bisphénol A. L'analyse de risque pour les polluants environnementaux doit donc prendre en compte la consommation de médicaments comme facteur pouvant hausser les niveaux internes pour une exposition donnée.

Mots clés : nonylphénol, bisphénol A, médicaments, biotransformation, modélisation pharmacocinétique à base physiologique, interactions.

PROBLÉMATIQUE

Les polluants environnementaux sont omniprésents et plusieurs d'entre eux représentent un danger pour la santé, tant humaine qu'environnementale. Le potentiel toxicologique de ces xénobiotiques est fortement lié à leur biotransformation puisque ce processus peut générer des métabolites de toxicité accrue ou moindre. Plusieurs facteurs tels l'âge, la génétique et les interactions métaboliques avec d'autres substances sont susceptibles de moduler le métabolisme de ces polluants. Alors que la consommation de produits pharmaceutiques prend des proportions jusqu'ici inégalées, les connaissances sont réduites quant aux interactions toxicocinétiques qui peuvent survenir lors d'une exposition simultanée aux médicaments et aux polluants environnementaux. La question suivante est alors soulevée: Est-il possible que la consommation de médicaments influence la biotransformation des polluants auxquels les humains sont exposés?

Malgré le fait que les recherches sur les interactions polluants-médicaments soient quasi-inexistantes, des études ont déjà démontré que l'acide acétylsalicylique (Aspirin) présente une interaction métabolique avec le benzène (Kowalowka-Zawieja *et al.*, 2003), le toluène (Lof *et al.*, 1990) et le m-xylène (Campbell *et al.*, 1988). Ces études poussent donc à croire que d'autres interactions peuvent survenir lors d'une exposition simultanée aux médicaments et aux polluants. La présente étude visait à identifier et caractériser les interactions métaboliques entre 14 médicaments d'usage répandu (acétaminophène, ibuprofène, diclofénac, acide méfénamique, naproxène, acide salicylique, acide valproïque, carbamazépine, amoxicilline, érythromycine, amoxicilline, sulfasalazine, ranitidine, cimétidine) et deux perturbateurs endocriniens : le nonylphénol et le bisphénol A.

CHAPITRE I

LE NONYLPHÉNOL

1.1 Sources et exposition

Les polyéthoxylates de nonylphénol sont utilisés tant au niveau industriel que domestique. Ils sont entre autres impliqués dans la fabrication de surfactants non-ioniques, de pesticides, de cosmétiques, de spermicide et de plusieurs autres produits ménagers (Cheng et Ding, 2002). Selon le Chemical Market Reporter, 110 000 tonnes de nonylphénol ont été produites aux Etats-Unis en 2000 pour la synthèse de produits éthoxylés. Ces composés sont biodégradés en nonylphénol à courte chaîne éthoxylée et en nonylphénol par plusieurs souches bactériennes (Liu *et al.*, 2006; Salvadori *et al.*, 2006; Mann et Boddy, 2000; John et White, 1998; Maki *et al.*, 1994).

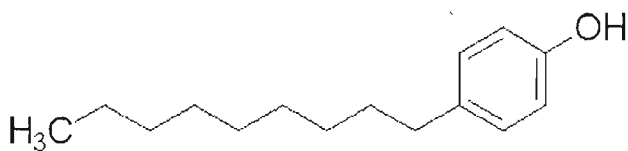


Figure 1.1 Structure moléculaire du nonylphénol

L'exposition au nonylphénol est liée au rejet des eaux usées domestiques et commerciales, à l'utilisation de produits qui en sont dérivés ainsi qu'à la consommation de nourriture

(Casajuana et Lacorte, 2004; Loyo-Rosales *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2003; Guenther *et al.*, 2002; Howe *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2001) et d'eau (Shao *et al.*, 2005; Kuch et Ballschmiter, 2001) contaminées. L'exposition humaine a été démontrée dans une étude de Calafat *et al.* (2005) par la présence de métabolites dans l'urine de 51% des échantillons d'une population référence aux États-Unis. Une autre étude effectuée au Japon par

Kawaguchi *et al.* (2004) a relevé des concentrations plasmatiques de l'ordre de 0,2-0,3 ng/ml chez l'humain. Des concentrations variant entre 19,8 à 84,4 ng/g de lipides ont été observées pendant l'étude de Muller *et al.* (1998) sur des échantillons de tissus adipeux humain. Enfin, l'exposition est supportée par la présence de nonylphénol dans le lait humain en concentrations variant entre 0,65 et 1,4 ng/g (Otaka *et al.*, 2003).

1.2 Toxicité

Le nonylphénol est un perturbateur endocrinien qui a la capacité de se lier au récepteur à oestrogènes (Laws *et al.*, 2000). Son potentiel oestrogénique a été démontré *in vivo* et *in vitro* sur plusieurs modèles expérimentaux. Les réponses oestrogéniques liées à l'exposition au nonylphénol chez l'humain ont été caractérisées sur des lignées de cellules placentaires BeWo (Bechi *et al.*, 2006) et des cellules du cancer du sein MCF-7 (Rajapakse *et al.*, 2004; Van den Belt *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2003; Vivacqua *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 1997). Des essais sur des cellules hypophysaires GH3/B6/F10 ont démontré que le nonylphénol affectait les flux membranaires de Ca^{2+} ER α dépendants et stimulait la libération de prolactine à des concentrations de l'ordre du picomolaire (Wozniak *et al.*, 2005). En plus de son potentiel oestrogénique, le nonylphénol exerce un effet antiandrogénique en inhibant l'activité transcriptionnelle du récepteur à androgènes (Xu *et al.*, 2005). Il peut aussi avoir un impact sur l'expression d'enzymes telles que les cytochromes CYP2C et CYP3A (Laurenzana *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1996), un phénomène pouvant perturber le métabolisme de la testostérone.

Le nonylphénol peut aussi avoir des impacts écotoxicologiques puisqu'il est rejeté dans l'environnement (Loos *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2005; Fries et Puttmann, 2003; Bester *et al.*, 2001). Cet alkylphénol perturbe le développement des testicules chez *Xiphophorus maculatus* et *Zoarcetes viviparus*, affectant ainsi le succès reproducteur des individus exposés (Kinnberg *et al.*, 2000; Christiansen *et al.*, 1998). De plus, il peut induire l'apoptose au niveau du thymus (Yao *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2005) et des testicules (Han *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003), induire la sécrétion d'insuline (Adachi *et al.*, 2005) et il possède un potentiel histopathologique au niveau du rein, du foie et de la rate (Schwaiger *et*

al., 2000). Au niveau benthique, il peut influencer la diversité et l'indice de maturation des nématodes (Hoss *et al.*, 2004). Son rejet dans l'environnement peut donc engendrer des perturbations écosystémiques, tant au niveau des individus que des communautés.

1.3 Toxicocinétique

Le nonylphénol a une demie-vie d'élimination de 3.1 heures lorsqu'il est administré par gavage chez le rat Sprague-Dawley mâle (Doerge *et al.*, 2002). Il est excrété majoritairement sous une forme conjuguée dans l'urine et dans les fèces dans des proportions pouvant varier selon le sexe et la souche (Green *et al.*, 2003; Zalko *et al.*, 2003). Le métabolite principal est un conjugué à l'acide glucuronique (Daidoji *et al.*, 2003). La glucuronidation du nonylphénol ou de ses métabolites hydroxylés se produit majoritairement au niveau du foie et dans une moindre mesure dans l'intestin (Daidoji *et al.*, 2006). Chez le rat, le nonylphénol est glucuronidé par l'isoenzyme uridine diphosphate glucuronosyltransférase 2B1 (Daidoji *et al.*, 2003).

Chez l'humain, la demie-vie d'élimination de la molécule mère dans le plasma varie entre 2 et 3 heures. Plus de 95% du nonylphénol est excrété du corps 8 heures après une dose orale de 5 mg. Le volume de distribution de 2800 L révélé par l'étude de Muller *et al.* (1998) suggère que le nonylphénol se distribue dans le tissu adipeux. Lors de la même étude, il a été observé que les quantités de métabolites conjugués dans le plasma sont environ 100 fois plus élevées lors d'une administration orale que lors d'une exposition intraveineuse. Ce fait traduit l'importance du métabolisme qui a lieu lors du premier passage hépatique.

Le potentiel de mimétisme endocrinien du nonylphénol est très fortement lié à son métabolisme. Selon l'étude de Moffat *et al.* (2001) effectuée avec un système d'activation transcriptionnelle chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la glucuronidation du nonylphénol élimine complètement sa capacité à induire la transcription de gènes via la liaison au récepteur oestrogénique. Étant donné que les effets néfastes les plus rapportés sont liés à l'induction d'une réponse oestrogénique, la glucuronidation de ce composé joue un rôle

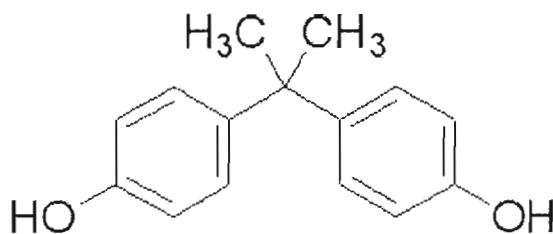
de premier plan dans sa détoxification. Puisque l'exposition au nonylphénol se fait majoritairement par voie orale et que le métabolisme lors du premier passage hépatique revêt d'une grande importance, une interaction métabolique à ce niveau risque d'augmenter les concentrations internes et par conséquent potentialiser l'impact d'une exposition.

CHAPITRE II

LE BISPHÉNOL A

2.1 Sources et exposition

Le bisphénol A est un produit intermédiaire de la production de résines d'époxy, de polycarbonate et de polyester (Matsumoto *et al.*, 2003). Selon le Chemical Market Associates Inc. (CMAI), 2,8 millions de tonnes de bisphénol A ont été produites mondialement pour l'année 2002. Le bisphénol A se retrouve dans plusieurs produits tels que les revêtements protecteurs, les scellants dentaires, les matériaux de construction, les



disques compacts, les verres de contact, les peintures et les teintures (Staples *et al.*, 1998). Ce polluant a été détecté dans plusieurs produits de consommation tels que les aliments en boîte de conserve (Kang *et al.*, 2006; Brotons *et al.*, 1995) et le lait (Maragou *et al.*, 2006; Casajuana et Lacorte, 2004;

Figure 2.1 Structure moléculaire du bisphénol A

Kang et Kondo, 2003). De plus, il a été démontré que le bisphénol A est présent dans les bouteilles pour bébé réutilisables et qu'il migre dans le liquide qu'elles contiennent (Biles *et al.*, 1997). L'exposition à ce polluant chez l'humain a été démontrée dans plusieurs études. Sa présence sous forme de métabolites a été observée dans 95 % des échantillons d'urine provenant d'une population référence aux Etats-Unis dans des concentrations allant de 0,22 à 5,18 µg/L pour les 10^e et 95^e centiles respectivement (Calafat *et al.*, 2005). D'autres études

ont aussi détecté du bisphénol A dans l'urine (Matsumoto *et al.*, 2003; Brock *et al.*, 2001). Des échantillons de lait maternel (Sun *et al.*, 2004; Otaka *et al.*, 2003), de sérum fœtal et de liquide amniotique (Ikezuki *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002) ont aussi révélé des quantités détectables de bisphénol A.

2.2 Toxicité

Le bisphénol A est reconnu comme étant un perturbateur endocrinien étant capable d'induire des réponses oestrogéniques. L'exposition au bisphénol A chez le rat Sprague-Dawley femelle a entraîné des différences morphologiques importantes au niveau du vagin (Schonfelder *et al.*, 2002). Des études sur des lignées cellulaires humaines du cancer du sein MCF-7 (Kitamura *et al.*, 2005; Schafer *et al.*, 1999) et du cancer de l'endomètre ECC-1 (Bergeron *et al.*, 1999) ont démontré que ce polluant peut induire une prolifération cellulaire normalement observée lors d'exposition au $17\text{-}\beta\text{ E}_2$. En plus de son potentiel oestrogénique, le bisphénol A possède une activité anti-androgénique. Il inhibe l'activité transcriptionnelle du DHT avec une CI_{50} de $0,746\text{ }\mu\text{M}$ (Xu *et al.*, 2005). L'activité anti-androgénique serait entre autre liée à une réduction des niveaux de CYP2C11/6 et de CYP3A2/1 qui sont responsables de l'activité testostérone 2α -hydroxylase (T2AH) et 6β -hydroxylase (T6BH) respectivement chez le rat. Tout comme le nonylphénol, le bisphénol A induit le relargage de prolactine par les cellules hypophysaires GH3/B6 à des concentrations de l'ordre du picomolaire (Wozniak *et al.*, 2005).

2.3 Toxicocinétique

Le bisphénol A a une demie-vie de 39,5 heures lorsqu'il est administré par voie intraveineuse chez le rat Fisher 344 mâle (Kurebayashi *et al.*, 2003). Il est éliminé majoritairement sous forme de métabolite conjugué à l'acide glucuronique dans la bile (Inoue *et al.*, 2001). Par contre, il a été démontré que des conjugués au sulfate et des métabolites hydroxylés peuvent aussi être retrouvés dans l'urine et les fèces (Elsby *et al.*, 2001). La conjugaison à l'acide

glucuronique est catalysée par l'enzyme uridine diphosphate glucuronosyltransférase 2B1 chez le rat (Yokota *et al.*, 1999). Cette réaction se produit majoritairement au niveau du foie, mais peut aussi être observée au niveau du tissu intestinal (Inoue *et al.*, 2003).

Chez l'humain, le bisphénol A a une demie-vie de moins de 6 heures dans le sang pour une exposition orale à 6 mg (Volkel *et al.*, 2002). Lors de cette dernière étude, seul son métabolite glucuronidé a été retrouvé dans l'urine et dans le sang. Alors que chez le rat ce métabolite est principalement excrété dans la bile, il est éliminé dans l'urine chez l'humain (Volkel *et al.*, 2002). L'étude de Elsby *et al.* (2001) a démontré que la conjugaison à l'acide glucuronique est moins importante chez l'humain que chez le rat. Des expériences sur *Saccharomyces cerevisiae* exprimant des cytochromes P450 humains ont permis d'observer le métabolisme du bisphénol A par plusieurs isoformes, mais principalement par CYP2C18 avec un K_m de 3,9 μM et un V_{max} de 8,1 nmol/min/nmol de cytochrome (Niwa *et al.*, 2001). Par contre, il semble que cette voie métabolique ne soit empruntée qu'en cas de saturation de la glucuronidation.

La glucuronidation du bisphénol A revêt d'une grande importance car le métabolite conjugué ne possède plus d'activité oestrogénique (Matthews *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2000). En plus de limiter l'exposition interne à la molécule mère, la glucuronidation limite la fraction du produit métabolisée par les cytochromes P450 qui mène à la formation de métabolites comme le 4-méthyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)pent-1-ène (MBP) qui a un potentiel oestrogénique plus grand que le bisphénol A (Yoshihara *et al.*, 2004) et le bisphénol-o-quinone qui peut former des adduits à l'ADN (Atkinson et Roy, 1995a; 1995b). Une interaction au niveau de la conjugaison du bisphénol A à l'acide glucuronique peut donc entraîner une plus grande exposition interne et la production de métabolites toxiques.

CHAPITRE III

LA CO-EXPOSITION AUX MÉDICAMENTS ET AUX PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

3.1 Consommation de médicaments

La consommation de médicaments est un phénomène grandissant à l'échelle mondiale. Selon l'Institut Canadien d'Information sur la Santé, la consommation de médicaments représente 17 % des dépenses en santé au Canada, soient 25,2 milliards de dollars. Ces chiffres dénotent une forte augmentation du pourcentage des dépenses vouées à l'achat de produits pharmaceutiques s'ils sont comparés aux 9,5 % qui y étaient destinés en 1985. La prise de médicament étant grandissante, la possibilité d'une exposition simultanée à des médicaments et à des polluants environnementaux est d'autant plus forte. La co-exposition étant un facteur pouvant conduire à des interactions pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, il est important d'investiguer cette problématique afin d'affiner l'analyse du risque lié à l'exposition à des polluants environnementaux. La présente étude visait à identifier et caractériser les interactions métaboliques entre 14 médicaments représentant quelques classes de traitement (*anti-pyrétique* : acétaminophène, *anti-inflammatoires non stéroïdiens* : ibuprofène, acide salicylique, acide méfénamique, diclofénac, naproxène, *anti-histaminiques* : cimétidine, *anti-convulsivants* : acide valproïque, carbamazépine, *anti-ulcéreux* : ranitidine, *hypoglycémiants* : gliclazide, *anti-rhumatique* : sulfasalazine, *antibiotiques* : erythromycine, amoxicilline) et deux perturbateurs endocriniens : le nonylphénol et le bisphénol A. Ces deux polluants étant principalement éliminés par voie de conjugaison à l'acide glucuronique, tout médicament affectant l'activité enzymatique des

uridine diphosphate glucuronosyltransférases, la synthèse ou le transport du cofacteur acide glucuronique uridine diphosphate (UDPGA) est susceptible d'inhiber leur détoxication.

3.2 Inhibition enzymatique

L'inhibition enzymatique est un phénomène qui s'observe lorsqu'une substance se lie à une enzyme et en affecte l'activité. L'inhibition peut prendre deux formes majeures, soient l'inhibition irréversible et l'inhibition réversible. L'inhibition irréversible se produit lorsque l'inhibiteur se lie de façon covalente à l'enzyme, une inactivation qui sera alors permanente. L'inhibition réversible se veut quant à elle une liaison temporaire de l'inhibiteur avec l'enzyme. Ce type d'inhibition peut prendre plusieurs formes dépendamment du type de liaison entre l'enzyme et l'inhibiteur. Si l'inhibiteur a la capacité de se lier au site catalytique de l'enzyme, l'inhibition sera dite compétitive. Cette inhibition se traduit par une hausse de la valeur du K_m apparent, ceci sans toutefois affecter la vitesse maximale de réaction. La vitesse de réaction peut alors être calculée à partir de l'équation 1 :

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_s}}\right) + [S]} \quad [1]$$

où v est la vélocité enzymatique, V_{\max} est la vélocité enzymatique maximale, S représente la concentration de substrat, K_m est la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat, I est la concentration en inhibiteur et K_{i_s} représente la constante d'inhibition de l'inhibiteur sur la réaction enzymatique avec le substrat.

Lorsque l'inhibiteur n'a la capacité que de se lier au complexe substrat-enzyme, l'inhibition qu'il génère est appelée incompétitive. Lors d'une telle inhibition, les valeurs de vélocité maximale et la constante d'affinité diminuent en fonction de la concentration en inhibiteur. La vélocité peut alors être exprimée selon l'équation 2 :

$$v = \frac{\left[V_{\max} / \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_s}} \right) \right] \times [S]}{\left[K_m / \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_s}} \right) \right] + [S]} \quad [2]$$

Certains inhibiteurs peuvent lier à la fois le site catalytique de l'enzyme et le complexe substrat-enzyme. Ces derniers donnent lieu à une inhibition de type mixte. Dans ce type d'interaction, il est possible d'observer à la fois une hausse dans le K_m et une baisse dans le V_{\max} . L'inhibition non-compétitive est un type d'inhibition mixte où il n'y a pas d'effet sur la constante d'affinité K_m . La vitesse enzymatique en cas d'inhibition non-compétitive peut se calculer avec l'équation 3 :

$$v = \frac{\left[V_{\max} / \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_s}} \right) \right] \times [S]}{K_m + [S]} \quad [3]$$

Il est possible de déterminer le type d'inhibition enzymatique par régression non-linéaire ou par régression linéaire à partir des données expérimentales d'activité enzymatique. Les méthodes de régression linéaires telles que le graphique de Dixon permettent la détermination du type d'inhibition enzymatique et de la constante d'inhibition (K_i) en fonction des courbes de tendance tracées à partir des données expérimentales. Par contre, Kakkar *et al.* (1999) ont démontré l'inexactitude de ces méthodes dans l'estimation du K_i , la variabilité des résultats étant dépendante des concentrations d'inhibiteur utilisées. La méthode par régression non-linéaire utilise quant à elle les différentes équations décrivant l'activité enzymatique en situation d'inhibition et sélectionne l'équation pouvant décrire le plus fidèlement possible les données expérimentales. Lors d'une telle approche, la nature de l'inhibition est déterminée en fonction de l'équation décrivant les données avec le meilleur R^2 , et la constante K_i est calculée par un processus d'optimisation avec les valeurs expérimentales.

3.3 Inhibition enzymatique par les médicaments

La majorité des médicaments subissent une biotransformation enzymatique avant d'être excrétés par le corps. Diverses enzymes catalysent le métabolisme de ces xénobiotiques via plusieurs réactions chimiques. Les réactions de réduction, d'oxydation et d'hydrolyse sont dites de phase I et peuvent être effectuées par plusieurs enzymes dont les cytochromes P450. Lors de cette phase, un groupe fonctionnel (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) est exposé ou introduit dans la molécule, résultant en une légère hausse dans l'hydrophilicité de cette dernière. Les réactions de conjugaison, notamment la glucuronidation, la sulfatation, la méthylation et la conjugaison au glutathion, sont dites de phase II et peuvent être précédées d'une réaction de phase I. Cette phase consiste en la liaison d'un cofacteur (ex : acide glucuronique, glutathion) à un groupe fonctionnel et induit une grande augmentation dans l'hydrophilicité de la molécule, facilitant ainsi son excrétion.

Il a été mentionné précédemment que le nonylphénol et le bisphénol A sont majoritairement biotransformés via une réaction de glucuronidation. La conjugaison à l'acide glucuronique est catalysée par les enzymes uridine diphosphate glucuronosyltransférase (UGT) qui sont retrouvées dans le réticulum endoplasmique du foie, des reins, de l'intestin, de la peau, du cerveau, de la rate et de la muqueuse nasale. Comme environ 35 % des produits pharmaceutiques métabolisés par la phase II sont biotransformés par le système de conjugaison à l'acide glucuronique (Evans et Relling, 1999), il est possible que des interactions compétitives au niveau de l'UGT qui métabolise le nonylphénol et le bisphénol A surviennent. Les UGT possèdent plusieurs isoformes qui sont divisés en deux familles : les UGT1 et les UGT2. Il existe 17 isoformes fonctionnels chez l'humain, soient les UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2A1, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 et UGT2B28 (Kiang *et al.*, 2005). Le rat possède quant à lui 13 isoformes fonctionnels, soient les UGT1A1, UGT1A2, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT2A1, UGT2B1, UGT2B2, UGT2B3, UGT2B6, UGT2B8 et UGT2B12 (Shelby *et al.*, 2003). Les isoformes exprimés peuvent varier d'un organe à l'autre. Le

nonylphénol et le bisphénol A sont glucuronidés par l'isoforme UGT2B1 chez le rat, un isoforme majoritairement exprimé dans le foie (Shelby *et al.*, 2003). Cette enzyme de conjugaison est connue pour catalyser la glucuronidation de plusieurs médicaments tels que le naproxène, l'acide salicylique, l'ibuprofène et le diclofénac (King *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 1994). Ces anti-inflammatoires non stéroïdiens sont donc susceptibles d'inhiber compétitivement la glucuronidation du nonylphénol et du bisphénol A. De plus, plusieurs médicaments sont reconnus pour être métabolisés par l'isoforme UGT2B7 chez l'humain, l'orthologue de l'UGT2B1 du rat (Staines *et al.*, 2004). Parmi ces médicaments se retrouvent la carbamazépine, le diclofénac, l'ibuprofène, le naproxène et l'acide valproïque (Kiang *et al.*, 2005). Il a aussi été démontré que l'acide méfénamique peut inhiber la glucuronidation du 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) par l'UGT2B7 dans les microsomes humains avec un K_i de 0,3 μ M, une concentration bien en deçà des concentrations maximales sanguines de 29 μ M suivant une administration de ce médicament (Mano *et al.*, 2007; Neuvonen et Kivisto, 1988). La glucuronidation de ce même substrat est aussi inhibée par le naproxène avec un K_i de 172 μ M, soit environ la moitié de la concentration sanguine maximale atteinte (374 μ M) lors de l'administration d'une dose de 1000 mg à relâchement contrôlé (Herber *et al.*, 1992; Mroszczak *et al.*, 1988). Une autre étude portant sur l'acide valproïque cette fois-ci a démontré que cet anti-convulsivant inhibe compétitivement la glucuronidation de l'AZT avec un K_i beaucoup plus élevé de $1,6 \pm 0.006$ mM (Ethell *et al.*, 2003). Les co-expositions entre ces médicaments et le nonylphénol ou le bisphénol A ont donc un potentiel d'interaction au niveau de l'enzyme.

3.4 Synthèse et transport du cofacteur

Outre l'inhibition enzymatique, les interactions métaboliques peuvent naître d'une incapacité de la cellule à fournir les cofacteurs nécessaires à la biotransformation. La conjugaison à l'acide glucuronique par les UGT est un processus impliquant plusieurs étapes qui comprend la synthèse du cofacteur et sa translocation dans le lumen du réticulum endoplasmique, lieu où se trouve le site catalytique des UGT. L'UDPGA est synthétisé à partir du glucose-1-phosphate. Ce composé est tout d'abord converti en UDP-glucose par l'enzyme UDP-

glucose pyrophosphorylase (Price et Jollow, 1988). L'UDP-glucose est ensuite oxydé deux fois successivement par l'UDP-glucose déshydrogénase, réaction nécessitant deux molécules de NAD^+ (Sommer *et al.*, 2004). Ces réactions se produisant dans le cytosol résultent en la

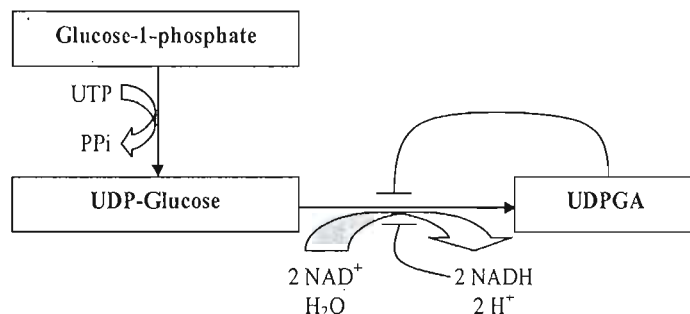


Figure 3.1 Biosynthèse du cofacteur UDPGA

formation de l'UDPGA (voir figure 3.1).

La glucuronidation reposant sur la disponibilité en UDPGA, il est évident que toute inhibition dans la synthèse de ce cofacteur induira une baisse dans les taux de conjugaison à ce dernier.

Certaines substances comme la piperine et l'éthanol sont connues pour inhiber l'activité de l'UDP-glucose déshydrogénase, interactions menant à une baisse dans les taux de glucuronidation (Reen *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1986; Aw et Jones, 1983). L'activité de cette enzyme est aussi sujette à l'inhibition par les produits, soient l'UDPGA et le NADH (Hjelle 1986). Il est possible que certains médicaments interagissent avec la synthèse de l'UDPGA, soit en inhibant des réactions enzymatiques ou en induisant des variations dans les concentrations de NADH. D'autre part, ce cofacteur doit subir une translocation du cytosol vers le lumen du réticulum endoplasmique pour permettre la réaction de conjugaison (Bossuyt et Blanckaert, 1997). Le passage de l'UDPGA dans le lumen du réticulum endoplasmique s'effectue via des antiporteurs transmembranaires, un mécanisme de transport qui est saturable (Banhegyi *et al.*, 1996; Battaglia *et al.*, 1996). Ce transport étant limitant pour les réactions de glucuronidation, une réduction dans l'activité des transporteurs par un médicament pourrait mener à une baisse dans les taux de conjugaison des polluants à l'acide glucuronique.

Un autre type d'interaction est possible lors de la co-exposition aux médicaments et aux polluants: la déplétion du contenu en cofacteur. Cette inhibition consiste en l'incapacité du système de régénération à combler la demande en cofacteur pour un processus enzymatique. Par exemple, ce phénomène peut se produire lorsqu'un médicament dont le métabolisme

implique la glucuronidation se trouve en grande quantité dans le foie. Selon l'étude de Price et Jollow (1984), une seule dose d'acétaminophène cause une déplétion rapide du contenu du foie en UDPGA et le temps requis pour régénérer le contenu de base est dose-dépendant. L'acide valproïque est aussi connu pour causer une diminution des stocks d'UDPGA allant jusqu'à 90 % (Howell *et al.*, 1986). Ces deux médicaments sont donc susceptibles de réduire l'activité de conjugaison envers le nonylphénol et le bisphénol A. Le fait que plusieurs autres produits pharmaceutiques soient aussi glucuronidés porte à croire que l'inhibition du métabolisme du nonylphénol et du bisphénol A par déplétion du cofacteur en cas de co-exposition avec des médicaments soit possible.

CHAPITRE IV

ARTICLE: INHIBITION OF BISPHENOL A AND NONYLPHENOL
BIOTRANSFORMATION BY SELECTED COMMONLY USED DRUGS

Marc-André Verner, Tatiana Magher, Sami Haddad

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal (Canada)

4.1 Contribution à l'article

La présente section vise à déclarer ma contribution à l'article « Inhibition of bisphenol A and nonylphenol biotransformation by selected commonly used drugs». Tout d'abord, j'ai élaboré les protocoles de recherche et effectué la majorité des expériences nécessaires afin d'atteindre les objectifs de l'étude. J'ai supervisé les expériences effectuées par Tatiana Magher, une stagiaire au laboratoire. Les simulations dont il est mentionné dans l'article ont été effectuées par Dr Haddad à l'aide d'un modèle pharmacocinétique à base physiologique élaboré par Teeguarden *et al.* (2005). Je suis responsable de l'écriture de la première version de l'article et du suivi des corrections apportées par Dr Haddad. Le manuscrit a été soumis le 15 janvier 2008 au journal *Toxicology and Applied Pharmacology*.

Liste d'auteurs : Marc-André Verner, Tatiana Magher, Sami Haddad

4.2 Abstract

Nonylphenol and Bisphenol A are endocrine disruptors often detected in human samples. These chemicals are detoxified through glucuronidation. Many factors including co-exposure to other xenobiotics are susceptible of reducing these glucuronidation rates. This study aimed to identify and characterize the potential metabolic interaction between 14 widely used drugs and these two endocrine disruptors. The identification phase was done by co-incubating freshly isolated rat hepatocytes with nonylphenol or bisphenol A, and drugs at a concentration 50 times higher than the reported maximal concentration (C_{max}) in human. Inhibition of pollutants biotransformation was seen with most of the drugs. Naproxen (18.7 mM), salicylic acid (24.5 mM), carbamazepine (1.9 mM) and mefenamic acid (1.45 mM) inhibited over 50 % of nonylphenol and bisphenol A metabolism in hepatocytes. Characterization of the inhibition observed with naproxen, salicylic acid and carbamazepine was attempted with rat liver microsomes. Naproxen and carbamazepine were found to competitively inhibit the glucuronidation of nonylphenol and bisphenol A. Salicylic acid did not show inhibition of glucuronidation rates at 1000 μ M in microsomal incubations, a finding suggesting that other mechanisms of action are involved. Simulations with a physiologically-based pharmacokinetic model showed that therapeutic levels of naproxen could lead to a 1.8 fold increase in both the C_{max} and the area under the curve of bisphenol A in humans, assuming a similar K_i value. In conclusion, this study shows that many drugs may inhibit the detoxification of chemicals such as nonylphenol and bisphenol A, and health risk assessment for environmental pollutants should therefore carefully address this issue.

Keywords: Nonylphenol, bisphenol A, drugs, glucuronidation, physiologically-based pharmacokinetic modeling, interactions.

4.3 Introduction

Nonylphenol (4-*n*-nonylphenol) and bisphenol A (4,4'-isopropylidene-2-diphenol) are widely used compounds that have been found to possess endocrine disrupting properties. Nonylphenol is the biodegradation product of nonylphenol polyethoxylates used in many industrial and household products such as latex paints, cosmetics and pesticides. Bisphenol A is used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins that are involved in food packaging production. Both chemicals were detected in food (Guenther *et al.*, 2002; Brotons *et al.*, 1995) and drinking water (Shao *et al.*, 2005; Kuch et Ballschmiter, 2001; Loyo-Rosales *et al.*, 2004).

Exposure to nonylphenol and bisphenol A has been shown to produce a wide range of effects in rodent and fish. The main concern regarding these chemicals is their endocrine disrupting properties mediated through their weak affinity for the oestrogen receptor. Their oestrogenic potential was observed *in vivo* with rats (Laws *et al.*, 2000) as well as *in vitro* with MCF-7 cells (Kitamura *et al.*, 2005; Vivacqua *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 1997) and BeWo cells (Bechi *et al.*, 2006).

Human exposure to nonylphenol and bisphenol A has been revealed by many studies in which urine (Brock *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2003), blood (Kawaguchi *et al.*, 2004), milk (Otaka *et al.*, 2003) and fetal serum (Ikezuki *et al.*, 2002) samples were analysed. The study conducted by Calafat *et al.* (2005) on 394 adults of a reference population in the United States has shown that bisphenol A and nonylphenol were present in 95 % and 51 % of urine samples respectively.

Nonylphenol and bisphenol A are extensively metabolized in the rat liver (Daidoji *et al.*, 2003; Pritchett *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2001) and intestine (Inoue *et al.*, 2003) tissues, mainly to glucuronide conjugates. Glucuronidation of these compounds inhibit their ability to bind the estrogen receptor (Matthews *et al.*, 2001; Moffat *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2000) and therefore plays an important role in protecting the organism from endocrine disruption. Conjugation to glucuronic acid is catalyzed by the uridine diphosphate

glucuronosyltransferase 2B1 (UGT2B1) in rats (Daidoji *et al.*, 2003; Yokota *et al.*, 1999). The UGTs responsible for the glucuronidation of these compounds in human still have yet to be unravelled. The toxicokinetics of these chemicals in human are characterized by short half-lives of 2 to 3 hours for nonylphenol (Doerge *et al.*, 2002) and 6 hours for bisphenol A (Volkel *et al.*, 2002).

The widespread use of drugs raises the possibility of co-exposure with environmental pollutants. The simultaneous exposure to drugs and nonylphenol or bisphenol A can possibly lead to pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. Considering that these endocrine disruptor effects are limited by their biotransformation to inactive glucuronidated metabolites and that they are cleared relatively rapidly, a metabolic inhibition by drugs can lead to increased effects for a given exposure. Many drugs such as naproxen, salicylic acid, ibuprofen, diclofenac are known to be glucuronidated by the UGT2B1 (King *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 1994) in rats and are therefore potential competitive inhibitors of this conjugation reaction. Moreover, the extensive glucuronidation of drugs like acetaminophen and valproic acid was reported to cause depletion of the UDP-glucuronic acid content in the liver (Howell *et al.*, 1986; Hjelle *et al.*, 1985; Price et Jollow 1984), possibly leading to a reduction in glucuronidation rates. Therefore it is important to assess the impact of drug consumption on bisphenol A and nonylphenol biotransformation to correctly characterize the risks of human exposure to these chemicals.

The objectives of this study were to i) identify potential metabolic interactions between 14 drugs that are widely used (acetaminophen, salicylic acid, ibuprofen, mefenamic acid, naproxen, amoxicillin, erythromycin, diclofenac, valproic acid, carbamazepine, gliclazide, cimetidine, ranitidine and sulfasalazine) and nonylphenol or bisphenol A using freshly isolated rat hepatocytes, ii) characterize the mechanisms underlying the three strongest identified interactions, and iii) assess the impact of bisphenol A metabolism inhibition on its global toxicokinetics in human using a physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model.

4.4 Methods

Chemicals

UDPGA (purity 99.7 %), Type IV Collagenase, 4-*n*-nonylphenol (purity 99.9 %), Bisphenol A (purity >99 %), 4-*tert*-octylphenol (purity >97 %), amoxicillin (purity 97.8 %), carbamazepine (purity >99 %), cimetidine (purity >99 %), ranitidine (purity >99 %), gliclazide (purity 99.5 %), erythromycin (purity 95.1 %), valproic acid (purity 100 %), naproxen (purity 98 %), sulfasalazine (purity 98 %), ibuprofen (purity 99.8 %), diclofenac (purity >99 %), acetaminophen (purity 100 %), mefenamic acid (purity 99.7 %), salicylic acid (purity 99.9 %), William's Medium E (WME) and newborn calf serum were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). HPLC solvents were of HPLC grade (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). All other chemicals were of analytical grade.

Animals

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories with the permission of the institutional committee for the protection of animals (CIPA). All animals were maintained under controlled temperature (20°C) and light cycle (12 h light / 12 h dark) with autoclaved rodent food and water available *ad libitum*. Rats were allowed to acclimate for 7 days prior to experiments. Hepatocytes were isolated from 164.9 ± 12 g rats whereas livers for microsomes preparation were obtained from 284.5 ± 2 g rats.

Isolation of rat hepatocytes

Hepatocyte isolation was done by a two step liver perfusion. Surgical procedures were made under isoflurane 5 % anaesthesia. The portal vein was cannulated with a 22 G catheter and the liver was perfused with calcium-free Hank's balanced salt solution (HBSS) containing HEPES (25 mM) and EGTA (0.5 mM) until complete removal of blood. Afterwards the liver was perfused with HBSS containing HEPES (25 mM), calcium chloride (1.7 mM) and type IV collagenase (100 U/ml) for approximately 20 minutes or until signs of complete digestion were observed. Perfusion solutions were adjusted to pH 7.5, continuously gassed with O₂/CO₂ (95 %/5 %) and kept at a flow rate of 15 ml/min. When perfusion was completed, the liver was extracted and dissected in William's Medium E (WME) containing HEPES (10

mM), sodium bicarbonate (25 mM) and newborn calf serum (10%) at pH 7.5 and maintained at a temperature of 4°C. The cell suspension was filtered through a 243µm filter. The filtrate was first washed by centrifugation at 35 x g for 3 minutes. The pellet was resuspended in WME in order to proceed to a Percoll differential centrifugation at 215 x g for 8 minutes. The pellet was resuspended in WME and washed again by centrifugation at 35 x g for 3 minutes. The remaining cells in the pellet were suspended in WME and cell count and viability were assessed by Trypan blue exclusion using a hemacytometer. Only cell preparations with viability greater than 80 % were kept for further experiments.

Rat microsomes preparation

Rats (n=4) were euthanized by CO₂ asphyxiation. Rat livers were removed and cut into approximately 1 g pieces prior to freezing in liquid nitrogen. Livers were kept at -80°C until microsome preparation. For each tube, 2 g of liver were homogenized in 8 ml of Tris (50 mM) KCl (150 mM) buffer at pH 7.5 using a potter. Samples were centrifuged for 20 minutes at 15,000 x g at 4°C. Supernatant was withdrawn and centrifuged for 60 minutes at 100,000 x g at 4°C. Supernatant containing the cytosol was discarded and microsomes were resuspended in 2 ml of Tris (50 mM) KCl (150 mM) Sucrose (250 mM) buffer at pH 7.5. Microsomes were pooled and then aliquoted into 500 µL samples prior to freezing in liquid nitrogen. All cell fractions were kept at -80°C until the experiments. Protein content was measured with the method described in Lowry *et al.* (1951).

Identification of drug-pollutant interactions in isolated hepatocytes suspensions

In order to identify interactions between drugs and the two endocrine disruptors, metabolic assays were done using a final concentration of 1×10^6 cells/ml in a rotating incubator at 37°C and 600 rpm. Hepatocytes were pre-incubated with drugs suspended in WME at a concentration 50 times higher than the maximal concentration observed in human blood (table 1) for 15 minutes. After pre-incubation, hepatocytes were exposed to 250 µM of nonylphenol for 60 minutes or 44 µM of bisphenol A for 15 minutes, concentrations representing the *K_m* found in the literature (Daidoji *et al.*, 2003; Teeguarden *et al.*, 2005). Ethanol solutions containing either nonylphenol or bisphenol A represented 0.5 % of the final volume. Reactions were stopped using acetonitrile containing the internal standard (4-*tert*-

octylphenol) at a volume equal to that of the reaction sample. Samples were subsequently put on ice. All samples were kept at -20°C until HPLC analysis. Incubations were done in borosilicate glassware to avoid adsorption of nonylphenol or bisphenol A. Experiments were done on three rats to corroborate results.

Drug-pollutant interaction characterization in microsomal incubations

Characterization of metabolic inhibitions was done using microsomes in a rotating incubator at 37 °C and 600 rpm. Assays were made in Tris (50 mM) KCl (150 mM) buffer at pH 7.5 containing MgCl₂ (5 mM), Brij58 (0.05%) and UDPGA (5 mM). Conjugation to glucuronic acid was linear for both pollutants for 0-15 minutes and 0-0.5 mg of protein/ml intervals. The protein concentration was set to 0.25 mg/ml and the incubation was set to 15 minutes. Determination of Michaelis-Menten kinetic constants for both pollutants alone was done by incubating microsomes with six different concentrations of substrate. In order to define the type of inhibition and the constant K_i for naproxen, salicylic acid, and carbamazepine, three substrate concentrations (62.5, 125 and 250 µM for nonylphenol; 50, 100 and 200 µM for bisphenol A) and four inhibitor concentrations were used. Concentrations of carbamazepine used were 125, 250, 500, 1000 µM for bisphenol A inhibition assays and 30, 100, 300, 1000 µM for nonylphenol inhibition assays. Concentrations of naproxen and salicylic acid used were 125, 250, 500, 1000 µM. Ethanol solutions containing the pollutants represented 1% of the final incubation volume. Reactions were stopped using acetonitrile containing the internal standard (octylphenol) at a volume equal to that of the reaction sample. Samples were subsequently put on ice.

Quantification of Bisphenol A and nonylphenol metabolism

Bisphenol A and nonylphenol metabolism rates were determined by the decrease in the unmetabolized chemical concentration. All samples were centrifuged at 10 000 x g for 2 minutes and supernatant was injected into a Agilent 1200 series high-performance liquid chromatography system. Bisphenol A was eluted using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6 x 50 mm, 1.8 µm) preceded by a 0.2 µm RRLC In-Line filter (4.6 mm), and an isocratic mobile phase of acetonitrile:water (45:55 v/v) at 1.5 ml/min, 25°C and detected with a fluorescence detector (excitation 227 nm, emission 313 nm). Retention times for this method

were 1.4 minutes for bisphenol A and 16.7 minutes for octylphenol. Nonylphenol chromatography was done with a Zorbax SB-C18 column (4.6 x 150 mm, 5 μ m) preceded by both a Zorbax SB-C18 guard column (4.6 x 12.5 mm, 5 μ m) and a 0.2 μ m RRLC In-Line filter (4.6 mm), and an isocratic mobile phase of acetonitrile:water (70:30 v/v) at 2 ml/min, 50°C and detected with a fluorescence detector (excitation 220 nm, emission 315 nm). Using this method, nonylphenol and octylphenol were retained in the column for 5.5 and 2.8 minutes respectively.

Impact of enzymatic inhibition on bisphenol A toxicokinetics in human

The impact of enzymatic inhibition on the toxicokinetics of bisphenol A in human was investigated using a PBPK model developed by Teeguarden *et al.* (2005). Briefly, the PBPK model for bisphenol A (see figure 1) was modified to introduce an inhibition factor on the metabolic rate (RAM) of BPA as follows:

$$RAM = (1 - IF) \times \frac{V_{Max} \times CVL}{KM + CVL} \quad [\text{eq. 1}]$$

or alternatively,

$$RAM = \frac{V_{Max} \times CVL}{KM (1 + C_i/K_i) + CVL} \quad [\text{eq. 2}]$$

where symbols IF, K_i and C_i are the fraction of inhibition, inhibition constant of the drug and the blood concentration of the inhibitor. And symbols CVL, V_{Max} and KM are the hepatic venous blood concentration, the maximal rate of metabolism and the affinity constant for bisphenol A, respectively. The simulations were run with different enzymatic inhibition scenarios; i) using eq. 1 and setting IF to 0 %, 50 %, 75 % and 95 % and ii) using eq. 2 and setting C_i to a constant concentration of naproxen representing the upper bound of the range for the maximal concentration in human plasma reported in Mrosczak *et al.* (1988) for an oral intake of a 1000 mg controlled-release tablet (473 μ M), and the K_i value determined experimentally with rat liver microsomes as described previously (843.1 μ M). The oral dose was set to 0.0641 mg/kg for a human male of 78 kg, and the simulation time was 42 hours. All

PBPK model parameters values except for those linked to inhibition by drugs were left intact from Teeguarden *et al.* (2005).

Statistics

Enzyme kinetic constants were determined by non-linear regression using SigmaPlot Enzyme Kinetics module (Systat Software Inc., San Jose, CA). PBPK modeling simulations were done using ACSLXtreme (Aegis Technologies Group, Inc., Huntsville, AL).

4.5 Results

Identification of metabolic interactions

Biotransformation of nonylphenol and bisphenol A was shown to be inhibited by many drugs in freshly isolated rat hepatocytes. Percentages of inhibition are depicted in figure 1. Inhibition of pollutants metabolism displayed a similar pattern for both nonylphenol and bisphenol A. Strong interactions were observed with naproxen and salicylic acid with more than 85 % reduction in biotransformation rates. Appreciable metabolic inhibition was also observed with carbamazepine, mefenamic acid, valproic acid, ibuprofen, diclofenac, sulphasalazine and acetaminophen. Incubations with erythromycine, gliclazide, ranitidine and amoxicillin showed either very low inhibition or no inhibition at all at a concentration 50X that of maximal blood concentration in human. No significant changes in hepatocyte viability were observed when samples were compared to control incubations (data not shown).

Characterization of nonylphenol and bisphenol A metabolism inhibition by naproxen, salicylic acid and carbamazepine

Assays with microsomes were done to evaluate the impact of co-exposure to naproxen, salicylic acid and carbamazepine on glucuronidation of nonylphenol and bisphenol A (figure 3). Nonlinear regression on biotransformation rates concluded on the competitive inhibition of pollutants biotransformation by naproxen with inhibition constants (K_i) of 581.7 μM for nonylphenol and 848.3 μM for bisphenol A (see figure 3). Regression equations describing competitive inhibition fitted experimental data with estimated kinetic constants described in table 2.

No inhibition was seen in co-incubation with salicylic acid in microsomes. The parallel slopes for the three different concentration of either nonylphenol or bisphenol A indicate that salicylic acid do not inhibit the biotransformation of these chemicals in microsomes at concentrations between 125 and 1000 μM . Higher concentrations of salicylic acid showed an interaction with bisphenol A and nonylphenol metabolism but this inhibition was correlated to the lowering of pH in the buffer solution by this drug.

Impact of co-exposure with naproxen on global toxicokinetics of bisphenol A in human

The PBPK model published by Teeguarden *et al.* (2005) was used to assess the potential impact of naproxen on global bisphenol A kinetics in human. The maximal blood concentration (C_{max}) and the area under the curve (AUC) for the 42 hour simulations are displayed in table 3 for 0 %, 50 %, 75 % and 100 % inhibitions as well as the inhibition by naproxen. The metabolic inhibition by a constant concentration of 473 μ M of naproxen yielded a 1.8 fold increase in both AUC and C_{max} of bisphenol A in blood.

4.6 Discussion

The growing use of drugs increases the chances of co-exposure with environmental pollutants. In the present study we screened for metabolic interactions between 14 widely consumed drugs representing different classes of treatment and two endocrine disruptors: nonylphenol and bisphenol A. We further addressed the nature of the strong inhibition caused by naproxen, salicylic acid and carbamazepine on the biotransformation of these pollutants.

Many metabolic interactions between drugs and pollutants were identified using freshly isolated rat hepatocytes. Inhibition was seen with many drugs when hepatocytes were pre-incubated for 15 minutes prior to biotransformation assay with nonylphenol or bisphenol A (see figure 1). The fact that inhibition patterns were similar for both pollutants led us to hypothesize that the mechanisms of interaction are identical. Nonylphenol and bisphenol A are metabolized primarily by conjugation to glucuronic acid, a reaction mediated by the enzyme UGT2B1. Therefore any interaction affecting this enzymatic reaction, cofactor synthesis or cofactor transport would result in a similar inhibition of pollutants biotransformation. The inhibition seen with naproxen, salicylic acid, ibuprofen and diclofenac could be explained by the fact that all these drugs were found to be metabolized to some extent by the UGT2B1 (Pritchard *et al.*, 1994; King *et al.*, 2001). Other drugs for which UGT isoforms catalyzing their glucuronidation in rats has not yet been characterized could also be metabolized by this enzyme. For example, carbamazepine is known to be glucuronidated by the isoform UGT2B7 in humans, a recognized ortholog of the UGT2B1 in rats (Staines *et al.*, 2004), and showed a high inhibitory potential in the biotransformation of both nonylphenol and bisphenol A. Other drugs causing an inhibition of pollutants metabolism such as diclofenac, ibuprofen, naproxen and valproic acid are also glucuronidated by the UGT2B7 in humans (Kiang *et al.*, 2005). The fourth highest inhibition in the present study was observed with incubations containing mefenamic acid, a drug that has been found to inhibit the glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) by UGT2B7 in human microsomes with a K_i of 0.3 μ M (Mano *et al.*, 2007). The antiepileptic drug valproic acid also inhibits competitively the glucuronidation of AZT with a higher K_i of 1.6 ± 0.006 mM

(Ethell *et al.*, 2003). Current data do not permit the analysis of the correlation between the rate of glucuronidation of drugs and their inhibitory potential, mainly because different drug concentrations were used in hepatocyte incubations. The inhibition of bisphenol A and nonylphenol metabolism in rat hepatocytes by drugs known to be glucuronidated by UGT2B1 (in rats) or UGT2B7 (in humans) or to inhibit these enzymes is thought to be at least partially explainable by an enzymatic interaction. Drugs that do not undergo glucuronidation by these enzymes seem to have a lower impact on bisphenol A and nonylphenol metabolism.

It is also possible that a decrease in UDPGA content or transport in hepatocytes lead to the inhibition of pollutants metabolism. UDPGA is the essential cofactor for conjugation to glucuronic acid. Its biosynthesis in the cytosol is the result of the conversion of glucose-1-phosphate (G1P) to uridine diphospho-glucose (UDPG) by the enzyme UDP-glucose pyrophosphorylase which is further converted to UDPGA by the enzyme UDP-glucose dehydrogenase (Price et Jollow 1988). The glucuronidation occurs in the endoplasmic reticulum lumen where the active site of UGTs is located. UDPGA has to be translocated from the cytosol to the endoplasmic reticulum lumen by transporters (Csala *et al.*, 2004; Bossuyt et Blanckaert, 2001; Banhegyi *et al.*, 1996; Battaglia *et al.*, 1996; Bossuyt et Blanckaert, 1996; Bossuyt et Blanckaert, 1995; Bossuyt et Blanckaert, 1994), a transport mechanism known to limit glucuronidation rates. Any drug depleting UDPGA either by its extensive glucuronidation or by the inhibition of the enzymes responsible for UDPGA biosynthesis will possibly inhibit the glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol. An inhibition of the UDPGA transport into the endoplasmic reticulum lumen could also lower the glucuronidation activity towards these pollutants. Among the drugs that were used in the present study, acetaminophen and valproic acid have been shown to decrease the UDPGA content in the liver (Howell *et al.*, 1986; Hjelle *et al.*, 1985; Price et Jollow 1984). The use of high concentrations of drugs that are glucuronidated to a high extent in the identification phase of this study were likely to decrease the cofactor concentration in hepatocytes, a condition leading to lower glucuronidation rates (Gregus *et al.*, 1983).

The strong inhibitions observed with naproxen, salicylic acid and carbamazepine retained our attention, hence our attempt to characterize the mechanisms underlying these interactions. The possibility of enzymatic inhibition was assessed with the use of rat liver microsomes. The biotransformation of nonylphenol and bisphenol A by microsomes was inhibited by naproxen and carbamazepine. The Dixon plots displayed slopes crossing above the x axis and to the left of the y axis, a specific feature of competitive inhibition kinetics (see figure 1). Inhibition constants (K_i) were calculated by nonlinear regression to fit experimental data. In co-incubations with naproxen, the K_i for nonylphenol (581.7 μM) and bisphenol A (848.3 μM) were a little bit above the maximal naproxen concentration (305-473 μM) found in human blood after administration of a 1000 mg controlled-release tablet in postprandial volunteers (Mroszczak *et al.*, 1988). This finding could be critical in risk assessment for these endocrine disruptors since a chronic consumption of naproxen could significantly decrease the metabolism in the intestine and liver tissue, an inhibition that will result in higher internal exposure. The K_i values found in co-incubations with carbamazepine were over an order of magnitude above the maximal concentration in human blood found in the literature. A significant metabolic interaction is therefore unlikely to happen at therapeutic levels.

Salicylic acid did not show any inhibition of bisphenol A and nonylphenol metabolism in rat liver microsomes. The major metabolite of salicylic acid in man and rat is salicyluric acid, the product of a conjugation to glycine (Hutt *et al.*, 1982). The generation of salicyl acyl glucuronide and salicyl phenolic glucuronide is a secondary pathway that increases in importance as the doses get higher (Patel *et al.*, 1990). The glucuronidation pathway by UGT2B7, the human ortholog of UGT2B1 in rat, has been characterized in supersomes by Kuehl *et al.* (2006). Salicylic acid was glucuronidated to the acyl and phenolic glucuronides with K_m of 1640 μM and 1242 μM respectively. While it would require a K_i of 1185.98 μM to trigger the 90% inhibition of nonylphenol metabolism in hepatocyte suspensions, salicylic acid did not inhibit the metabolism of either bisphenol A or nonylphenol at a concentration of 1000 μM . Therefore, it is hypothesized that mechanisms other than direct enzymatic inhibition might be involved. Among these possible mechanisms, salicylic acid induced lowering of pH from 7.5 to 7.2 in hepatocyte suspensions might partially explain the

inhibition but is very unlikely to be the only factor. Further experiments are needed in order to address the possibility of disruption in UPDGA homeostasis or transport by either salicylic acid or one of its metabolites. Also, the impact of salicyluric acid, the primary salicylic acid metabolite, on glucuronidation rates of bisphenol A and nonylphenol should be assessed.

The use of PBPK modeling to assess the impact of naproxen consumption on bisphenol A toxicokinetics revealed that physiological levels of naproxen are susceptible of significantly increasing the C_{max} and AUC of bisphenol A in human. However, it must be noted that the simulations did not take into account the binding of naproxen to serum proteins, that the naproxen level was that of the upper bound of observed C_{max} in human for the whole simulation time, and that the K_i value used for the simulation was the one found in rat microsomes incubations. Therefore, the impact of co-exposure could differ *in vivo* in humans. Further studies are needed in order to evaluate the impact of naproxen on bisphenol A binding in to serum proteins, a phenomenon potentially leading to a higher free fraction in blood. Also, characterization of the inhibition constants with human microsomes would refine the analysis. Finally, a PBPK model of naproxen could be coupled to the bisphenol A model to simulate the relevant pharmacokinetic scenario in which the naproxen concentration changes over time. Although some parameters were lacking in the simulations, PBPK modeling clearly showed that the inhibitory potential of naproxen on metabolism of bisphenol A is susceptible of causing significant changes in its global kinetics.

In conclusion, inhibition of bisphenol A and nonylphenol biotransformation by drugs can occur at high therapeutic levels as revealed by interaction assays in the present study. Risk assessment should therefore include the use of drugs as a potential factor increasing the internal levels of pollutants. Particularly, chronic use of drugs during critical time windows of sexual development or carcinogenesis, periods at which endocrine disrupters are susceptible of triggering enhanced toxic effects, should be carefully addressed. Further assays are planned in order to characterize the mechanism of inhibition seen with salicylic acid as well as to refine the impact of naproxen on bisphenol A toxicokinetics in humans. Finally, additional studies are

needed to screen for other metabolic interactions between drugs and environmental pollutants.

4.7 Acknowledgments

These studies were supported by a Discovery Grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Sami Haddad is recipient of a research scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Authors would also like to thank Dr. Justin Teeguarden for generously providing the ACSL code for the bisphenol A PBPK model.

4.8 Figure legend

Figure 1. Schematic representation of the PBPK model for bisphenol A by Teeguarden *et al.* 2005. and interaction with the drug. Absorption is described by an intravenous infusion rate (k_{iv}) or an first order constant for oral absorption (k_a) into the gastro-intestinal tract (GI tract). The compound distributes into four tissue compartments (blood, body, uterus and liver) which are interconnected by blood perfusion. Bisphenol A can bind to plasma protein (PP) in the blood compartment and to the estrogen receptor (ER) according to maximal binding capacity (B_{max}) and dissociation constants (K_d). Bisphenol A is converted to the glucuronoconjugate (BPAG) in the liver according to a maximal rate (V_{max}) and an enzyme affinity constant (K_m). A fraction of the BPAG is directly excreted to bile (Bile) in the GI tract and the remains stays in systemic circulation (1-Bile) and can be eliminated into urine with a first order rate (k_{eur}). The BPAG in the the GI tract is excreted through feces in a first order process (k_{ef}) or is converted back into bisphenol A and reabsorbed with a with first order rate constant (k_{ehrc}). A number of drugs in this study can interfere in glucuronidation process and inhibit formation of conjugate (K_i or I_F).

Figure 2. Inhibition of the biotransformation of nonylphenol and bisphenol A by drugs in freshly isolated rat hepatocytes ($n=3$). Incubations were done at 37°C and 600 rpm for 15 minutes and 60 minutes for bisphenol A (44 μ M) and nonylphenol (250 μ M) respectively. Initial drug concentrations were equal to 50 times the maximal concentrations at therapeutic doses in humans (see table 1). Error bars represent the standard deviation.

Figure 3. Michaelis-Menten kinetics for nonylphenol and bisphenol A in pooled rat liver micromes ($n=4$). Incubations were done at 37°C and 600 rpm using a protein concentration of 0.25 mg/ml for 15 minutes. Error bars represent the standard deviation.

Figure 4. Dixon plots for inhibition of nonylphenol (● 62.5 μ M, ○ 125 μ M, ▼ 250 μ M) and bisphenol A (● 50 μ M, ○ 100 μ M, ▼ 200 μ M) metabolism by naproxen, salicylic acid and naproxen in pooled rat liver micromes ($n=4$). Incubations were done at 37°C and 600 rpm using a protein concentration of 0.25 mg/ml for 15 minutes. Error bars represent the standard deviation.

Figure 5. Simulation of bisphenol A toxicokinetics in human using a PBPK model. Different curves represent 0 %, 50 %, 75 % and 95 % metabolic inhibition scenarios, as well as inhibition by a constant naproxen concentration of 473 μ M.

4.9 Figures

Figure 1.

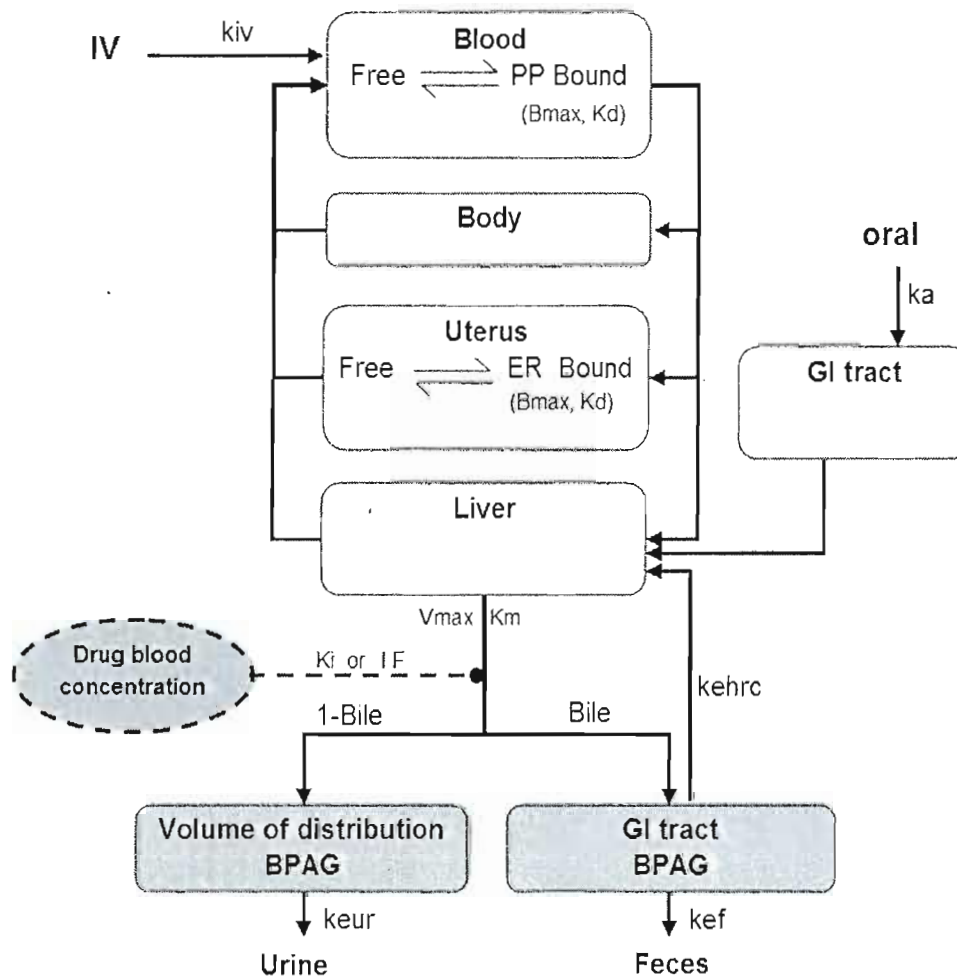


Figure 2.

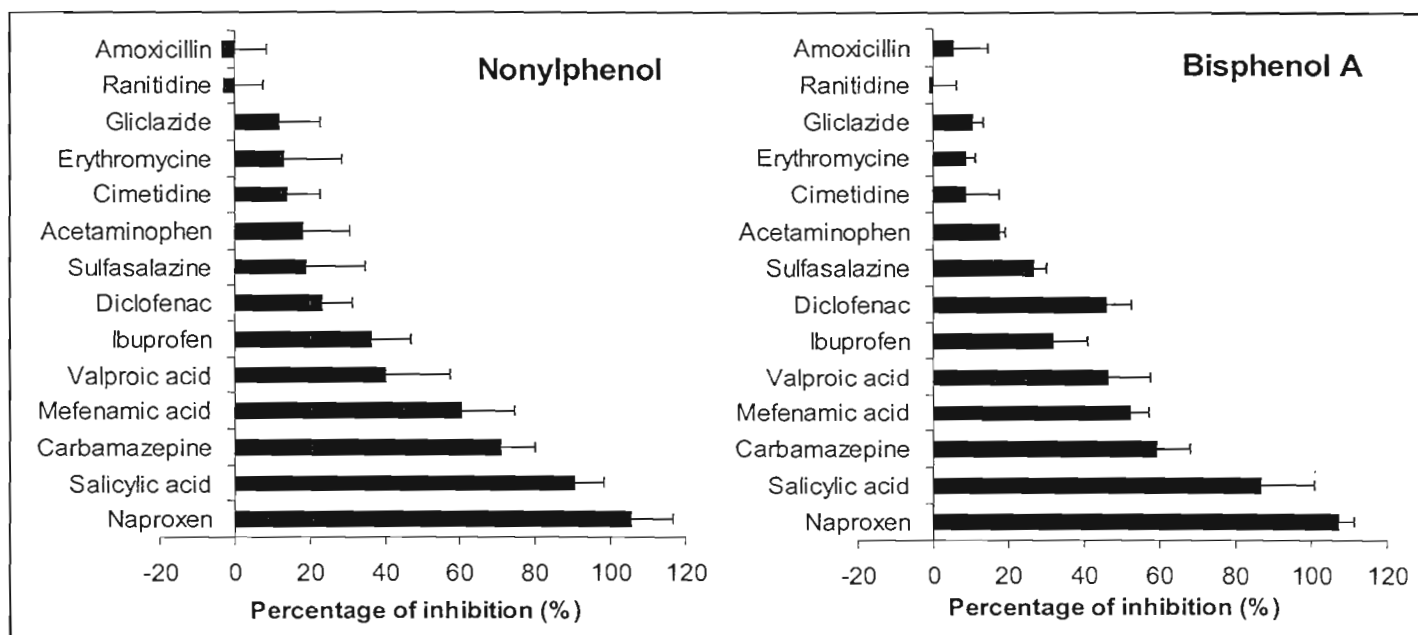


Figure 3.

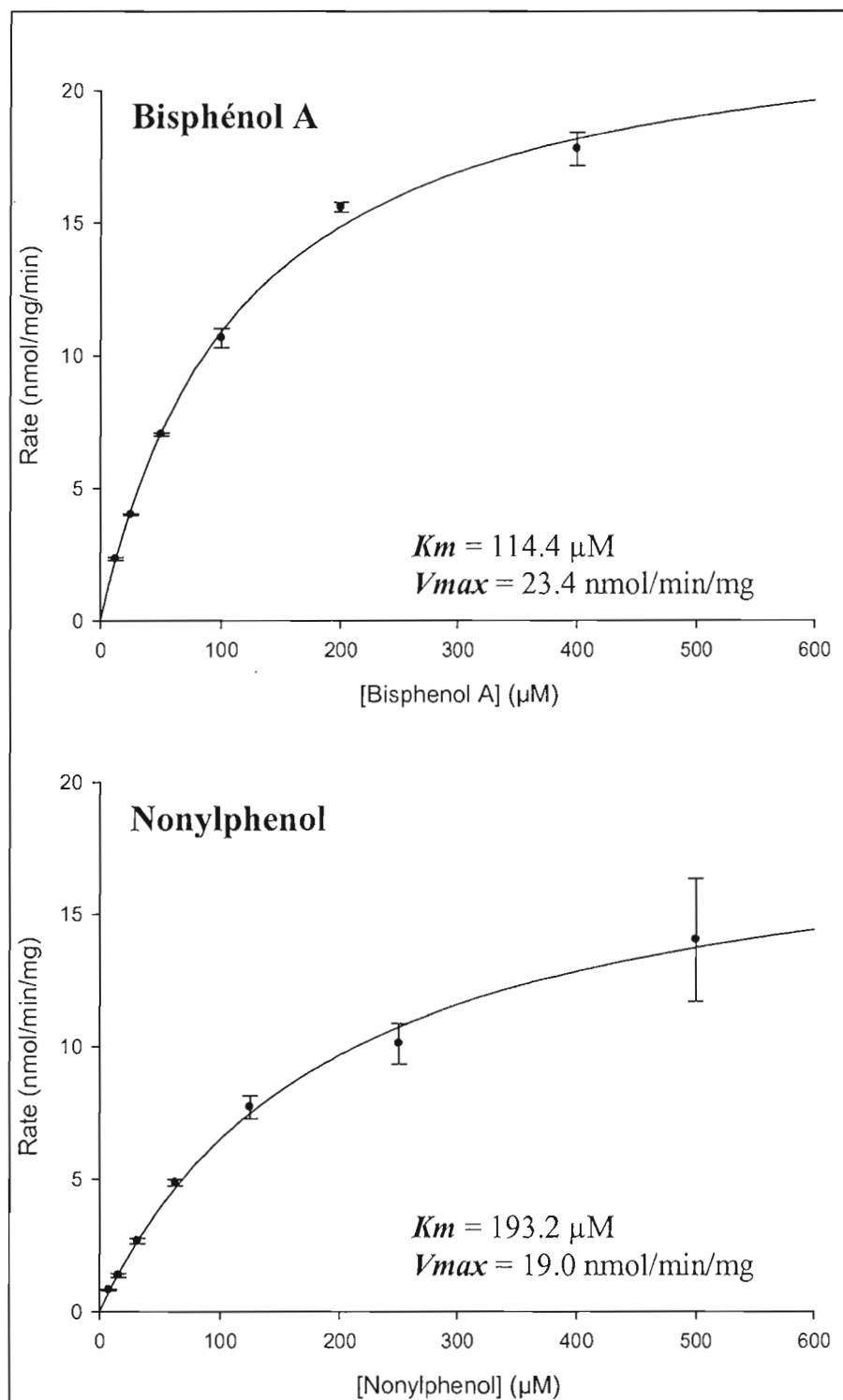


Figure 4.

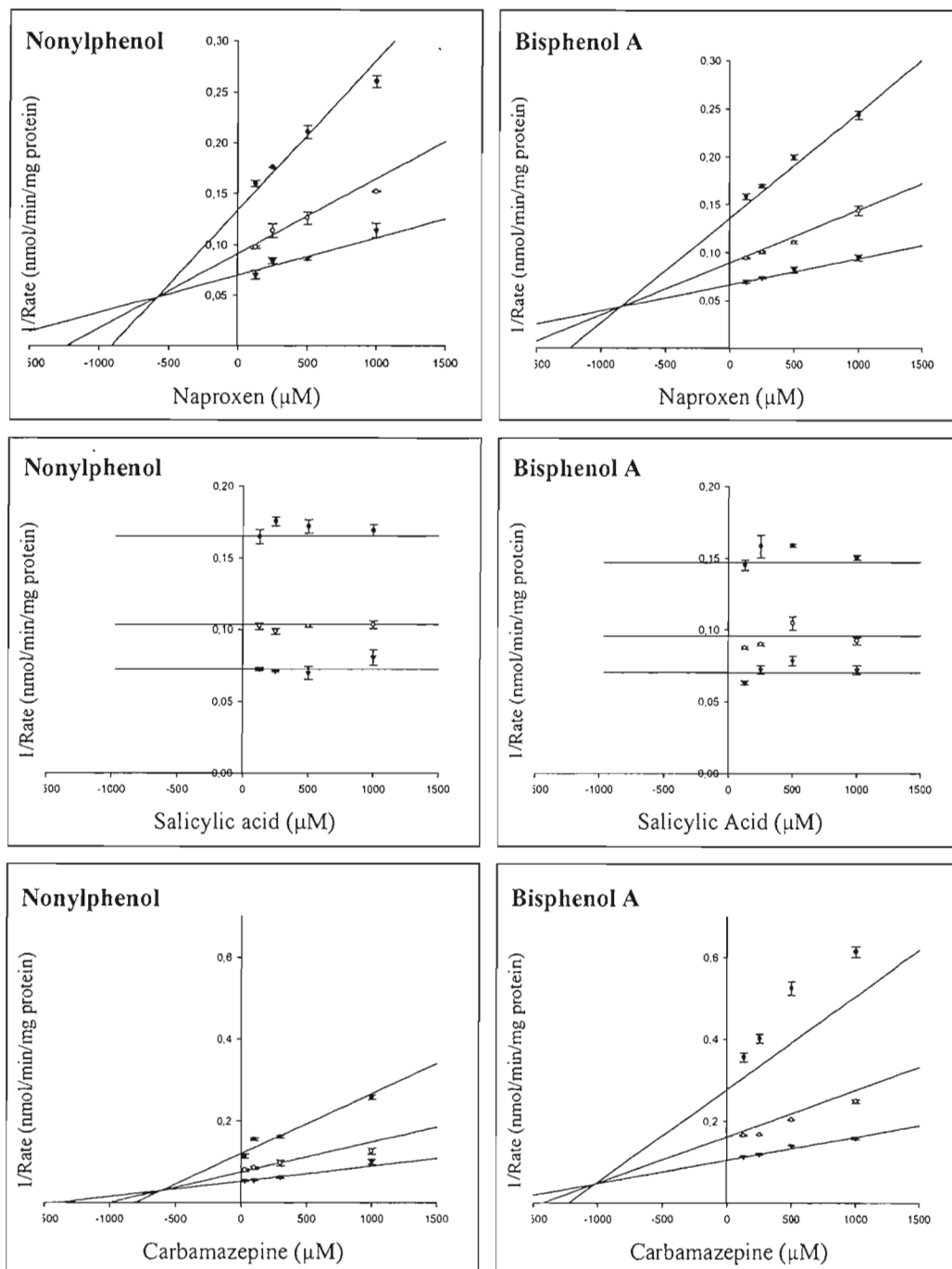
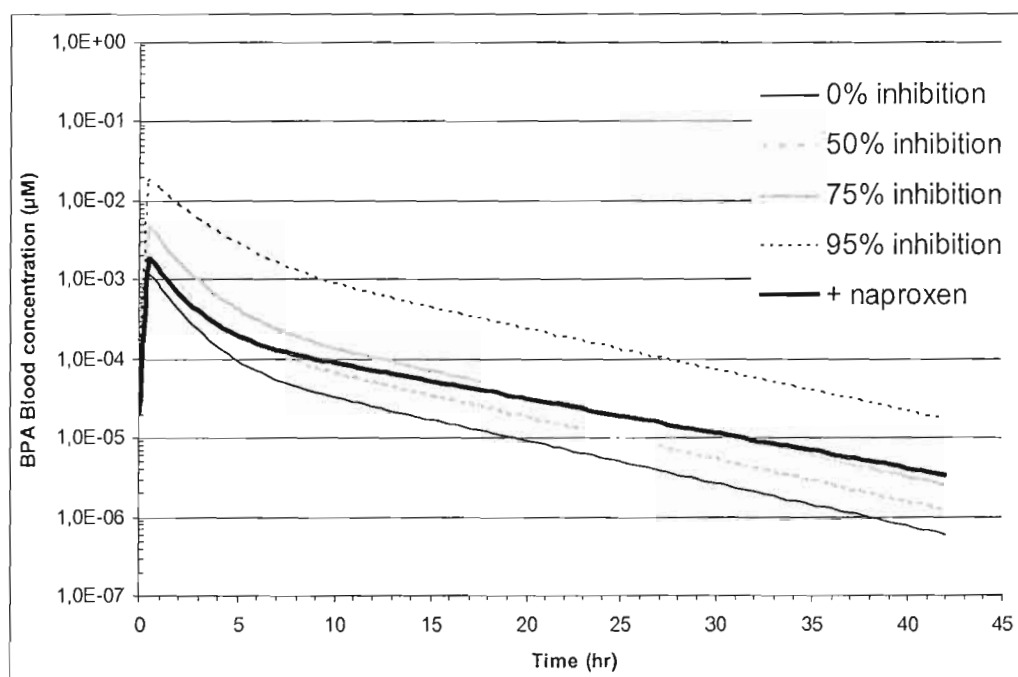
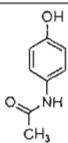
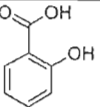
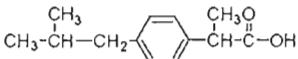
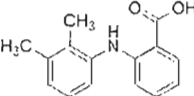
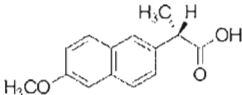
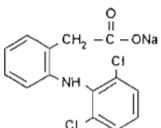
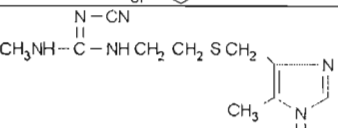
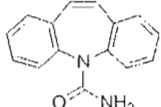


Figure 5.



4.10 Tables

Table 1. Maximum drug concentrations in human blood and drug concentrations used in the identification stage using freshly isolated rat hepatocytes.

| Drugs | Chemical structure | Plasma C _{max} (μM) | Drug concentration in assays (mM) | Reference |
|----------------|---|------------------------------|-----------------------------------|--|
| Acetaminophen |  | 100 | 5 | APC 2005 |
| Salicylic acid |  | 490 | 24.5 | Brantmark <i>et al.</i> (1982) |
| Ibuprofen |  | 50 | 2.5 | De Brabander <i>et al.</i> (2000) |
| Mefenamic acid |  | 29 | 1.45 | Neuvonen et Kivisto (1988) |
| Naproxen |  | 374 | 18.7 | Mroszczak <i>et al.</i> (1988) |
| Diclofenac |  | 5 | 0.25 | Kirchheiner <i>et al.</i> (2003) |
| Cimetidine |  | 12 | 0.6 | Grahnén <i>et al.</i> (1979) |
| Valproic acid | $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CHCOO}^- \text{Na}^+$ | 481 | 24.05 | Hussein <i>et al.</i> (1994) |
| Carbamazepine |  | 38 | 1.9 | Loonen <i>et al.</i> (1989) Miller et Ludden (1993) |

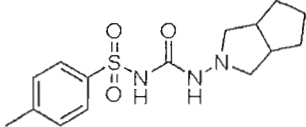
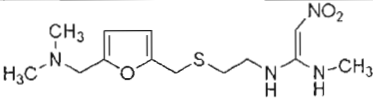
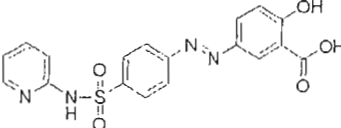
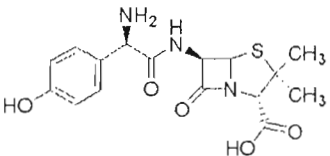
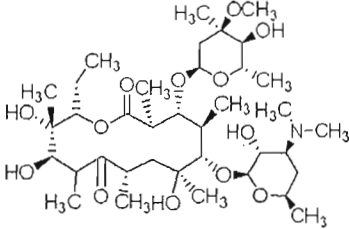
| | | | | |
|---------------|---|----|------|---|
| Gliclazide |  | 46 | 2.3 | Davis <i>et al.</i> (2000) |
| Ranitidine |  | 1 | 0.05 | Morichau-Beauchant <i>et al.</i> (1986) |
| Sulfasalazine |  | 14 | 0.7 | Allgayer <i>et al.</i> (1984) |
| Amoxicillin |  | 9 | 0.45 | Bodey et Nance (1972) |
| Erythromycin |  | 4 | 0.2 | Thompson <i>et al.</i> (1980) |

Table 2. Kinetic constants for inhibition of bisphenol A and nonylphenol glucuronidation by naproxen and carbamazepine in pooled rat liver microsomes (n=4).

| Pollutant | <i>K_i</i> for naproxen (μM) | <i>K_i</i> for carbamazepine (μM) |
|--------------------|---|--|
| Nonylphenol | 581.7 | 608.3 |
| Bisphenol A | 848.3 | 1023.1 |

Table 3. Area under the curve (AUC) and maximum concentration (C_{max}) for bisphenol A in human using a PBPK model for metabolic inhibition by naproxen, as well as for 0 %, 50 %, 75 % and 95 % metabolic inhibition.

| Inhibition | C_{max} (μM) | AUC |
|-------------------|------------------------------|------------|
| 0% | 0.0015 | 0.0029 |
| 50% | 0.0030 | 0.0056 |
| 75% | 0.0056 | 0.0113 |
| 95% | 0.0201 | 0.0562 |
| Naproxen | 0.0023 | 0.0053 |

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Le Naproxène

La consommation de médicaments étant grandissante dans la population, les risques de co-exposition aux produits pharmaceutiques et aux polluants environnementaux sont d'autant augmentés. La présente étude visait à caractériser l'impact de la consommation médicamenteuse sur la biotransformation de deux perturbateurs endocriniens auxquels les humains sont exposés : le nonylphénol et le bisphénol A. Les recherches effectuées sur les hépatocytes de rat fraîchement isolés et des microsomes ont permis d'identifier plusieurs interactions métaboliques et de caractériser la forte inhibition enzymatique causée par la co-exposition avec le naproxène, un anti-inflammatoire non stéroïdien. La constante d'inhibition (K_i) étant près des concentrations sanguines maximales atteintes avec une posologie de 1000 mg de naproxène, l'impact d'une co-exposition sur le métabolisme du nonylphénol et du bisphénol A peut être très important. L'étude d'une telle interaction serait toutefois incomplète sans l'inclusion d'autres paramètres physiologiques qui peuvent influencer la cinétique des polluants et du naproxène. C'est donc dans cette optique que sont proposées les pistes de recherche suivantes.

5.1.1 Impacts sur la liaison aux protéines dans le sérum

La liaison aux protéines sériques telles que l'albumine peut influencer la concentration en médicaments et en polluants libres dans le sang. Seule la fraction non-liée est disponible

pour la distribution dans les organes, et par conséquent pour le métabolisme hépatique. Il est donc primordial de bien caractériser l'impact de la présence de médicaments sur la liaison des polluants aux protéines sériques. À basse concentration sanguine, la fraction libre d'une substance dans le sang peut être déterminée par l'équation 4 :

$$f_l = \frac{1}{(Alb) \times \left(\frac{N_1}{K_1} + \frac{N_2}{K_2} \right) + 1} \quad [4]$$

où f_l représente la fraction libre, Alb représente la concentration en albumine, N et K représentent le nombre de site de liaison et la constante de dissociation pour les sites de haute

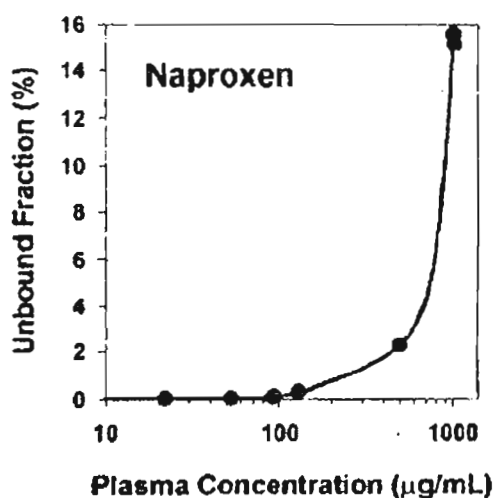


Figure 4.1 Fraction de naproxène libre en fonction de la concentration plasmatique

libre augmente. Étant donné que les concentrations sanguines maximales chez l'humain peuvent atteindre des valeurs au-dessus de 400 µM, un phénomène de saturation des sites de liaison sur l'albumine peut être observé *in vivo*.

affinité (1) et les sites de basse affinité (2) de l'albumine. L'étude de Borga et Borga (1997) révèle des valeurs de N_1 (0.814), N_2 (5.49), K_1 (0.203 µM) et K_2 (55.7 µM) pour le naproxène. Il est possible de visualiser cette association à l'albumine avec les données expérimentales obtenues lors de cette même étude (figure 4.1). À basse concentration, la fraction libre de naproxène dans le sang est presque nulle. Cependant, à des concentrations de l'ordre de 100 µg/mL (434 µM), la liaison semble atteindre un certain niveau de saturation et la fraction

Des données sur le bisphénol A démontrent que ce polluant est aussi fortement lié à l'albumine. La concentration de bisphénol A lié peut être calculée à l'aide de l'équation 5 :

$$C_{liée} = \frac{B_{max} \times C_{BPA}}{Kd + C_{BPA}} \quad [5]$$

où $C_{liée}$ est la concentration liée, C_{BPA} est la concentration en bisphénol A, B_{max} est la valeur maximale de liaison non-spécifique et Kd représente la constante de dissociation. Des valeurs de 2 mM et 0.1 mM pour le B_{max} et le Kd respectivement ont été déterminées expérimentalement par Csanady *et al.* (2002) pour le bisphénol A. Cette étude révèle que le bisphénol A est à environ 95 % lié lorsqu'il se retrouve en faibles concentrations sanguines. Il est donc possible que la présence de naproxène interagisse avec la liaison du bisphénol A sur l'albumine et par conséquent induire une augmentation de la fraction libre. En assumant que la constante d'inhibition (Ki) de la liaison du bisphénol A sur l'albumine par le naproxène a la même valeur que la constante de dissociation du site de haute affinité ($K1$) ou de basse affinité ($K2$), il est possible d'estimer quel peut être l'impact d'une co-exposition sur la fraction libre du bisphénol A dans le sang selon l'équation 6:

$$C_{liée} = \frac{B_{max} \times C_{BPA}}{Kd \left(1 + \frac{Ci}{Ki} \right) + C_{BPA}} \quad [6]$$

Où Ci et Ki représentent la concentration en inhibiteur et la constante d'inhibition respectivement. Alors que la fraction liée pour le bisphénol A est de 95 % en exposition simple, la co-exposition avec le naproxène avec l'assumption que la constante d'inhibition est égale à $K1$ ou $K2$ ramène cette fraction à 1 % et 72 % respectivement. En augmentant ainsi la fraction libre, la cinétique du polluant change et l'exposition interne peut être augmentée. Des expériences seraient nécessaires afin de caractériser cette interaction au niveau de la liaison du nonylphénol et du bisphénol A à l'albumine.

5.1.2 Cinétique globale du bisphénol A

Tel que mentionné dans l'article, il serait important d'affiner les simulations du bisphénol A en co-exposition avec le naproxène. Un modèle PBPK du naproxène serait utile pour déterminer sa concentration hépatique en fonction du temps, facteur important dans l'évaluation de l'inhibition du métabolisme du bisphénol A par ce dernier. En couplant les deux modèles, il serait possible d'évaluer plusieurs scénarios d'exposition différents en représentant plus fidèlement les cinétiques respectives des deux substances. De plus, des études *in vitro* avec des microsomes hépatiques humains permettraient de définir la constante d'inhibition dans l'organisme visé. Une telle approche permettrait une meilleure analyse du risque posé par la co-exposition, et par conséquent un positionnement plus éclairé.

5.2 L'acide salicylique

Alors que les études d'inhibition dans des suspensions d'hépatocytes pour les co-expositions avec l'acide salicylique et le bisphénol A ou le nonylphénol ont démontré une forte interaction, il a été impossible de caractériser cette inhibition avec la fraction microsomiale. L'inhibition n'étant pas enzymatique, du moins pour l'acide salicylique à des concentrations allant jusqu'à 1000 μM , d'autres études sont nécessaires. En premier lieu, des incubations avec de plus hautes concentrations d'acide salicylique seraient intéressantes. De plus, des études d'interaction avec les métabolites de l'acide salicylique pourront aussi être effectuées afin de voir si ces composés peuvent être à l'origine des inhibitions observées en hépatocytes. Enfin, l'impact de l'acide salicylique et de ses métabolites sur la synthèse et le transport de l'UDPGA pourra aussi être évalué.

5.3 Conclusion

Il a été démontré que plusieurs médicaments ont le potentiel d'inhiber la biotransformation du bisphénol A et du nonylphénol. Il est donc très important d'inclure la consommation médicamenteuse en tant que facteur pouvant influencer le métabolisme lorsque l'on fait l'analyse du risque lié à l'exposition à des polluants environnementaux. De plus, il serait important de poursuivre les études d'identification et de caractérisation des interactions métaboliques avec d'autres médicaments et polluants afin d'adapter les limites d'exposition à la réalité de la consommation grandissante de produits pharmaceutiques.

BIBLIOGRAPHIE

Adachi, T., Yasuda, K., Mori, C., Yoshinaga, M., Aoki, N., Tsujimoto, G., Tsuda, K. 2005. Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. *Food Chem Toxicol* **43**: 713-719.

Allgayer, H., Kruis, W., Eisenburg, J., Paumgartner, G. 1984. Comparative pharmacokinetics of sulphasalazine and sulphapyridine after rectal and oral administration to patients with ulcerative colitis. *Eur J Clin Pharmacol* **26**: 275-277.

Atkinson, A. et Roy, D. (1995a). In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen* **26**: 60-66.

Atkinson, A. et Roy, D. 1995b. In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 424-433.

Aw, T. Y. et Jones, D. P. 1983. Intracellular inhibition of UDP-glucose dehydrogenase during ethanol oxidation. *Chem Biol Interact* **43**: 283-238.

Banhegyi, G., Braun, L., Marcolongo, P., Csala, M., Fulceri, R., Mandl, J., Benedetti, A. 1996. Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* **315** (Pt 1): 171-176.

Battaglia, E., Nowell, S., Drake, R. R., Mizeracka, M., Berg, C. L., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., Gollan, J. L., Lester, R., Radomska, A. 1996. Two kinetically-distinct components of UDP-glucuronic acid transport in rat liver endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1283**: 223-231.

Bechi, N., Ietta, F., Romagnoli, R., Focardi, S., Corsi, I., Buffi, C., Paulesu, L. 2006. Estrogen-like response to p-nonylphenol in human first trimester placenta and BeWo choriocarcinoma cells. *Toxicol Sci* **93**: 75-81.

Bergeron, R. M., Thompson, T. B., Leonard, L. S., Pluta, L., Gaido, K. W. 1999. Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* **150**: 179-187.

Bester, K., Theobald, N., Schroder, H. F. 2001. Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere* **45**: 817-826.

Biles, J. E., McNeal, T. P., Begley, T. H., Hollifield, H. C. 1997. Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids. *J Agri Food Chem* **45**: 3541-3544

Bodey, G. P. et Nance, J. 1972. Amoxicillin: in vitro and pharmacological studies. *Antimicrob Agents Chemother* **1**: 358-362.

Borga, O. et Borga, B. 1997. Serum protein binding of nonsteroidal antiinflammatory drugs: a comparative study. *J Pharmacokinet Biopharm* **25**: 63-77.

Bossuyt, X. et Blanckaert, N. 1994. Carrier-mediated transport of intact UDP-glucuronic acid into the lumen of endoplasmic-reticulum-derived vesicles from rat liver. *Biochem J* **302** (Pt 1): 261-269.

Bossuyt, X. et Blanckaert, N. 1995. Mechanism of stimulation of microsomal UDP-glucuronosyltransferase by UDP-N-acetylglucosamine. *Biochem J* **305** (Pt 1): 321-328.

Bossuyt, X. et Blanckaert, N. 1996. Uridine diphosphoxylose enhances hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity by stimulating transport of UDP-glucuronic acid across the endoplasmic reticulum membrane. *Biochem J* **315** (Pt 1): 189-193.

Bossuyt, X. et Blanckaert, N. 1997. Carrier-mediated transport of uridine diphosphoglucuronic acid across the endoplasmic reticulum membrane is a prerequisite for UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver. *Biochem J* **323** (Pt 3): 645-648.

Bossuyt, X. et Blanckaert, N. 2001. Differential regulation of UDP-GlcUA transport in endoplasmic reticulum and in Golgi membranes. *J Hepatol* **34**: 210-214.

Brantmark, B., Wahlin-Boll, E., Melander, A. 1982. Bioavailability of acetylsalicylic acid and salicylic acid from rapid-and slow-release formulations, and in combination with dipyridamol. *Eur J Clin Pharmacol* **22**: 309-314.

Brock, J. W., Yoshimura, Y., Barr, J. R., Maggio, V. L., Graiser, S. R., Nakazawa, H. Needham, L. L. 2001. Measurement of bisphenol A levels in human urine. *J Expo Anal Environ Epidemiol* **11**: 323-328.

Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* **103**: 608-612.

Calafat, A. M., Kuklenyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., Needham, L. L. 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* **113**: 391-395.

Campbell, L., Wilson, H. K., Samuel, A. M., Gompertz, D. 1988. Interactions of m-xylene and aspirin metabolism in man. *Br J Ind Med* **45**: 127-132.

Casajuana, N. et Lacorte, S. 2004. New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *J Agric Food Chem* **52**: 3702-3707.

Cheng, C. Y. et Ding, W. H. 2002. Determination of nonylphenol polyethoxylates in household detergents by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **968**: 143-150.

Christiansen, T., Korsgaard, B., Jespersen, A. 1998. Effects of nonylphenol and 17 beta-oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. *J Exp Biol* **201**: 179-192.

Csala, M., Staines, A. G., Banhegyi, G., Mandl, J., Coughtrie, M. W., Burchell, B. 2004. Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **68**: 1353-1362.

Csanady, G. A., Oberste-Frielinghaus, H. R., Semder, B., Baur, C., Schneider, K. T., Filser, J. G. 2002. Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol* **76**: 299-305.

- Daidoji, T., Inoue, H., Kato, S., and Yokota, H. 2003. Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metab Dispos* **31**: 993-998.
- Daidoji, T., Ozawa, M., Sakamoto, H., Sako, T., Inoue, H., Kurihara, R., Hashimoto, S., Yokota, H. 2006. Slow elimination of nonylphenol from rat intestine. *Drug Metab Dispos* **34**: 184-190.
- Davis, T. M., Daly, F., Walsh, J. P., Ilett, K. F., Beilby, J. P., Dusci, L. J., Barrett, P. H. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide in Caucasians and Australian Aborigines with type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol* **49**: 223-230.
- De Brabander, C., Vervaet, C., Gortz, J. P., Remon, J. P., Berlo, J. A. 2000. Bioavailability of ibuprofen from matrix mini-tablets based on a mixture of starch and microcrystalline wax. *Int J Pharm* **208**: 81-86.
- Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R. R., Delclos, K. B. 2002. Mass spectrometric determination of p-nonylphenol metabolism and disposition following oral administration to Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol* **16**: 45-56.
- Elsby, R., Maggs, J. L., Ashby, J., Park, B. K. 2001. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J Pharmacol Exp Ther* **297**: 103-113.
- Ethell, B. T., Anderson, G. D., Burchell, B. 2003. The effect of valproic acid on drug and steroid glucuronidation by expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol* **65**: 1441-1449.
- Evans, W. E. et Relling, M. V. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **286**: 487-491.
- Fernandes, A. R., Costley, C. T., Rose, M. 2003. Determination of 4-octylphenol and 4-nonylphenol congeners in composite foods. *Food Addit Contam* **20**: 846-852.
- Fries, E. et Puttmann, W. 2003. Occurrence and behaviour of 4-nonylphenol in river water of Germany. *J Environ Monit* **5**: 598-603.

- Grahnén, A., von Bahr, C., Lindström, B., Rosen, A. 1979. Bioavailability and pharmacokinetics of cimetidine. *Eur J Clin Pharmacol* **16**: 335-340.
- Green, T., Swain, C., Van Miller, J. P., Joiner, R. L. 2003. Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat. *Regul Toxicol Pharmacol* **38**: 43-51.
- Gregus, Z., Watkins, J. B., Thompson, T. N., Klaassen, C. D. 1983. Depletion of hepatic uridine diphosphoglucuronic acid decreases the biliary excretion of drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **225**: 256-262.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T. 2002. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol* **36**: 1676-1680.
- Han, X., Tu, Z., Wang, X., Shen, S., Hou, Y. 2004. Nonylphenol induced apoptosis in rat testis through the Fas/FasL pathway. *Bull Environ Contam Toxicol* **73**: 620-627.
- Han, X. D., Tu, Z. G., Gong, Y., Shen, S. N., Wang, X. Y., Kang, L. N., Hou, Y. Y., Chen, J. X. 2004. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod Toxicol* **19**: 215-221.
- Herber, R., Magdalou, J., Haumont, M., Bidault, R., van Es, H., Siest, G. 1992. Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine in human liver microsomes: enzyme inhibition by drugs and steroid hormones. *Biochim Biophys Acta* **1139**: 20-24.
- Hjelle, J. J. 1986. Hepatic UDP-glucuronic acid regulation during acetaminophen biotransformation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **237**: 750-756.
- Hjelle, J. J., Hazelton, G. A., Klaassen, C. D. 1985. Acetaminophen decreases adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate and uridine diphosphoglucuronic acid in rat liver. *Drug Metab Dispos* **13**: 35-41.
- Hoss, S., Traunsperger, W., Severin, G. F., Jüttner, I., Pfister, G., Schramm, K. W. 2004. Influence of 4-nonylphenol on the structure of nematode communities in freshwater microcosms. *Environ Toxicol Chem* **23**: 1268-1275.

Howe, S. R., Surana, P., Jakupca, M. R., Borodinsky, L. 2001. Potential dietary exposure to p-nonylphenol from food-contact use of tris(nonylphenyl)phosphite (TNPP). *Food Addit Contam* **18**: 1021-1039.

Howell, S. R., Hazelton, G. A., Klaassen, C. D. 1986. Depletion of hepatic UDP-glucuronic acid by drugs that are glucuronidated. *J Pharmacol Exp Ther* **236**: 610-614.

Hussein, Z., Mukherjee, D., Lamm, J., Cavanaugh, J. H., Granneman, G. R. 1994. Pharmacokinetics of valproate after multiple-dose oral and intravenous infusion administration: gastrointestinal-related diurnal variation. *J Clin Pharmacol* **34**: 754-759.

Hutt, A. J., Caldwell, J., Smith, R. L. 1982. The metabolism of aspirin in man. *Xenobiotica* **12**: 601-610.

Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., Taketani, Y. 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* **17**: 2839-2841.

Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H., Kato, S. 2003. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos* **31**: 140-144.

Inoue, K., Kondo, S., Yoshie, Y., Kato, K., Yoshimura, Y., Horie, M., Nakazawa, H. 2001. Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods. *Food Addit Contam* **18**: 157-164.

John, D. M. et White, G. F. 1998. Mechanism for biotransformation of nonylphenol polyethoxylates to Xenoestrogens in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **180**: 4332-8.

Kakkar, T., Boxenbaum, H., Mayersohn, M. 1999. Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug Metab Dispos* **27**(6): 756-762

Kang, J. H. et Kondo, F. 2003. Determination of bisphenol A in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Food Prot* **66**: 1439-1443.

Kang, J. H., Kondo, F., Katayama, Y. 2006. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* **226**: 79-89.

Kawaguchi, M., Inoue, K., Sakui, N., Ito, R., Izumi, S., Makino, T., Okanouchi, N., Nakazawa, H. 2004. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **799**: 119-125.

Kiang, T. K., Ensom, M. H., Chang, T. K. 2005. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* **106**: 97-132.

King, C., Tang, W., Ngui, J., Tephly, T., Braun, M. 2001. Characterization of rat and human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of diclofenac. *Toxicol Sci* **61**: 49-53.

Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., Jespersen, A. 2000. Effects of nonylphenol and 17beta-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *J Exp Biol* **203**: 171-181.

Kirchheiner, J., Meineke, I., Steinbach, N., Meisel, C., Roots, I., Brockmoller, J. 2003. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. *Br J Clin Pharmacol* **55**: 51-61.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S. 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol Sci* **84**: 249-259.

Kowalowka-Zawieja, J., Zielinska-Psuj, B., Plewka, A. 2003. Metabolic interactions between acetylsalicylic acid and benzene. *Toxicology* **188**: 161-170.

Kuch, H. M. et Ballschmiter, K. 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol* **35**: 3201-3206.

Kuehl, G. E., Bigler, J., Potter, J. D., Lampe, J. W. 2006. Glucuronidation of the aspirin metabolite salicylic acid by expressed UDP-glucuronosyltransferases and human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **34**: 199-202.

Kurebayashi, H., Betsui, H., Ohno, Y. 2003. Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* **73**: 17-25.

Laurenzana, E. M., Weis, C. C., Bryant, C. W., Newbold, R., Delclos, K. B. 2002. Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes, and estrogen receptor alpha expression. *Food Chem Toxicol* **40**: 53-63.

Laws, S. C., Carey, S. A., Ferrell, J. M., Bodman, G. J., Cooper, R. L. 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* **54**: 154-167.

Lee, P. C., Patra, S. C., Struve, M. 1996. Modulation of rat hepatic CYP3A by nonylphenol. *Xenobiotica* **26**: 831-838.

Liu, X., Tani, A., Kimbara, K., Kawai, F. 2006. Metabolic pathway of xenoestrogenic short ethoxy chain-nonylphenol to nonylphenol by aerobic bacteria, *Ensifer* sp. strain AS08 and *Pseudomonas* sp. strain AS90. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 552-559.

Lof, A., Wallen, M., Wigaeus Hjelm, E. 1990. Influence of paracetamol and acetylsalicylic acid on the toxicokinetics of toluene. *Pharmacol Toxicol* **66**: 138-141.

Loonen, A. J., Toll, P. J., Nijdam, J. R. 1989. A comparison of carbamazepine divitabs with carbamazepine normal formulation in psychiatric and oligophrenic patients. Preliminary pharmacokinetic results. *Pharm Weekbl Sci* **11**: 23-26.

Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G., Eisenreich, S. J. 2007. LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* **66**: 690-699.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

Loyo-Rosales, J. E., Rosales-Rivera, G. C., Lynch, A. M., Rice, C. P., Torrents, A. 2004. Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. *J Agric Food Chem* **52**: 2016-2020.

Maki, H., Masuda, N., Fujiwara, Y., Ike, M., Fujita, M. 1994. Degradation of alkylphenol ethoxylates by *Pseudomonas* sp. strain TR01. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2265-2271.

Mann, R. M. et Boddy, M. R. 2000. Biodegradation of a nonylphenol ethoxylate by the autochthonous microflora in lake water with observations on the influence of light. *Chemosphere* **41**: 1361-1369.

Mano, Y., Usui, T., Kamimura, H. 2007. Inhibitory potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* **63**: 211-216.

Maragou, N. C., Lampi, E. N., Thomaidis, N. S., Koupparis, M. A. 2006. Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1129**: 165-173.

Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G. L., Morita, M., Kawamoto, T. 2003. Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* **111**: 101-104.

Matthews, J. B., Twomey, K., Zacharewski, T. R. 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* **14**: 149-157.

Miller, R. et Ludden, T. M. 1993. Bioavailability of controlled release carbamazepine estimated by mixed effect modelling. *Eur J Clin Pharmacol* **44**: 231-235.

Moffat, G. J., Burns, A., Van Miller, J., Joiner, R., Ashby, J. 2001. Glucuronidation of nonylphenol and octylphenol eliminates their ability to activate transcription via the estrogen receptor. *Regul Toxicol Pharmacol* **34**: 182-187.

Morichau-Beauchant, M., Houin, G., Mavie, P., Alexandre, C., Dhumeaux, D. 1986. Pharmacokinetics and bioavailability of ranitidine in normal subjects and cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* **31**: 113-118.

Mroszczak, E., Yee, J. P., Bynum, L. 1988. Absorption of naproxen controlled-release tablets in fasting and postprandial volunteers. *J Clin Pharmacol* **28**: 1128-1131.

Muller, S., Schmid, P., Schlatter, C. Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. 1998. *Environ Toxicol Pharmacol* **5**(4): 257-265.

Nagy, P., Fekete, J., Sharma, V. K. 2005. Octylphenol and nonylphenol in surface water of Rackevei-Soroksari Danube branch, Hungary. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **40**: 1679-1688.

Neuvonen, P. J. et Kivisto, K. T. 1988. Effect of magnesium hydroxide on the absorption of tolafenamic and mefenamic acids. *Eur J Clin Pharmacol* **35**: 495-501.

Niwa, T., Fujimoto, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F., Katagiri, M. 2001. Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biol Pharm Bull* **24**: 1064-1067.

Otaka, H., Yasuhara, A., Morita, M. 2003. Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction. *Anal Sci* **19**: 1663-1666.

Patel, D. K., Notarianni, L. J., Bennett, P. N. 1990. Comparative metabolism of high doses of aspirin in man and rat. *Xenobiotica* **20**: 847-854.

Price, V. F. et Jollow, D. J. 1984. Role of UDPGA flux in acetaminophen clearance and hepatotoxicity. *Xenobiotica* **14**: 553-559.

Price, V. F. et Jollow, D. J. 1988. Mechanism of decreased acetaminophen glucuronidation in the fasted rat. *Biochem Pharmacol* **37**: 1067-1075.

Pritchard, M., Fournel-Gigleux, S., Siest, G., Mackenzie, P., Magdalou, J. 1994. A recombinant phenobarbital-inducible rat liver UDP-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase 2B1) stably expressed in V79 cells catalyzes the glucuronidation of morphine, phenols, and carboxylic acids. *Mol Pharmacol* **45**: 42-50.

Pritchett, J. J., Kuester, R. K., Sipes, I. G. 2002. Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab Dispos* **30**: 1180-1185.

Rajapakse, N., Silva, E., Scholze, M., Kortenkamp, A. 2004. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ Sci Technol* **38**: 6343-6352.

Reen, R. K., Jamwal, D. S., Taneja, S. C., Koul, J. L., Dubey, R. K., Wiebel, F. J., Singh, J. 1993. Impairment of UDP-glucose dehydrogenase and glucuronidation activities in liver and small intestine of rat and guinea pig in vitro by piperine. *Biochem Pharmacol* **46**: 229-238.

Ren, L., Marquardt, M. A., Lech, J. J. 1997. Estrogenic effects of nonylphenol on pS2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells-MCF-7. *Chem Biol Interact* **104**: 55-64.

Salvadori, L., Gioia, D. D., Fava, F., Barberio, C. 2006. Degradation of low-ethoxylated nonylphenols by a *Stenotrophomonas* strain and development of new phylogenetic probes for *Stenotrophomonas* spp. detection. *Curr Microbiol* **52**: 13-20.

Schafer, T. E., Lapp, C. A., Hanes, C. M., Lewis, J. B., Wataha, J. C., Schuster, G. S. 1999. Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. *J Biomed Mater Res* **45**: 192-197.

Schonfelder, G., Flick, B., Mayr, E., Talsness, C., Paul, M., Chahoud, I. 2002. In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia* **4**: 98-102.

Schwaiger, J., Spieser, O. H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., Negele, R. D. 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol* **51**: 69-78.

Shao, B., Hu, J., Yang, M., An, W., Tao, S. 2005. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. *Arch Environ Contam Toxicol* **48**: 467-473.

Shelby, M.K., Cherrington, N.J., Vansell, N.R., Klaasen, C.D. 2003. Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab Dispos* **31**(3): 326-333

Shen, H., Xu, P., Yu, W., Liu, Y., Wu, D. 2003. Effects of p-nonylphenol on expression of ER protein and ER alpha mRNA of MCF-7 cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **34**: 641-644.

Singh, J., Dubey, R. K., Atal, C. K. 1986. Piperine-mediated inhibition of glucuronidation activity in isolated epithelial cells of the guinea-pig small intestine: evidence that piperine lowers the endogenous UDP-glucuronic acid content. *J Pharmacol Exp Ther* **236**: 488-493.

Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C., Fennell, T. R. 2000. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **168**: 225-234.

Sommer, B. J., Barycki, J. J., Simpson, M. A. 2004. Characterization of human UDP-glucose dehydrogenase. CYS-276 is required for the second of two successive oxidations. *J Biol Chem* **279**: 23590-23596.

Staines, A. G., Coughtrie, M. W., Burchell, B. 2004. N-glucuronidation of carbamazepine in human tissues is mediated by UGT2B7. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 1131-1137.

Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T., Harris, L. R. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* **36**: 2149-2173.

Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Nakashima, K. 2004. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* **18**: 501-507.

Teeguarden, J. G., Waechter, J. M. Jr, Clewell, H. J. 3rd, Covington, T. R., Barton, H. A. 2005. Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci* **85**: 823-838.

Thompson, P. J., Burgess, K. R., Marlin, G. E. 1980. Influence of food on absorption of erythromycin ethyl succinate. *Antimicrob Agents Chemother* **18**: 829-831.

Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., Witters, H. 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17beta-estradiol, estrone, 17alpha-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat Toxicol* **66**: 183-195.

Vivacqua, A., Recchia, A. G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., Di Gioia, M. L., Leggio, A., Bonofiglio, D., Liguori, A., Maggiolini, M. 2003. The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine* **22**: 275-284.

Volkel, W., Colnot, T., Csanady, G. A., Filser, J. G., Dekant, W. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* **15**: 1281-1287.

Wang, X., Han, X., Hou, Y., Yao, G., Wang, Y. 2003. Effect of nonylphenol on apoptosis of Sertoli cells in vitro. *Bull Environ Contam Toxicol* **70**: 898-904.

Wozniak, A. L., Bulayeva, N. N., Watson, C. S. 2005. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca^{2+} fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* **113**: 431-439.

Xu, L. C., Sun, H., Chen, J. F., Bian, Q., Qian, J., Song, L., Wang, X. R. 2005. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* **216**: 197-203.

Yamada, H., Furuta, I., Kato, E. H., Kataoka, S., Usuki, Y., Kobashi, G., Sata, F., Kishi, R., Fujimoto, S. 2002. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* **16**: 735-739.

Yao, G., Hu, Y., Liang, J., Hou, Y. 2005. Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *Life Sci* **77**: 3306-3320.

Yao, G., Yang, L., Hu, Y., Liang, J., Liang, J., Hou, Y. 2006. Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization. *Mol Immunol* **43**: 915-926.

Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S., Yuasa, A. 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* **340** (Pt 2): 405-409.

Yoshihara, S., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K., Ohta, S. 2004. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci* **78**: 50-59.

Zalko, D., Costagliola, R., Dorio, C., Rathahao, E., Cravedi, J. P. 2003. In vivo metabolic fate of the xeno-estrogen 4-n-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab Dispos* **31** : 168-178.